

Le système phosphatasique du Thymus

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier

le 7 Mars 1945

PAR

HENRI SOUCHE

Pharmacien

Licencié ès sciences physiques

Ex-préparateur à la Faculté de Pharmacie

Lauréat de la Faculté de Pharmacie

Médaille d'argent

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(MENTION : PHARMACIE)

JURY	{	MM. A. ASTRUC, Doyen, <i>Président.</i>	{	<i>Assesseurs.</i>
		E. CANALS, Professeur.		
		R. GRANGER, Chargé de Cours.		

MONTPELLIER

IMPRIMERIE DE LA CHARITÉ

1945

SOUCHE (Henri). —

Le système phosphatasique du thymus. — *Montpellier, Imp. de la Charité, 1945, 8 courbes, 132 p. in-8°.*

(Thèse Pharm., Montpellier, 1945, n° 310.)

SOUCHE (Henri). —

Le système phosphatasique du thymus. — *Montpellier, Imp. de la Charité, 1945, 8 courbes, 132 p. in-8°.*

(Thèse Pharm., Montpellier, 1945, n° 310.)

SOUCHE (Henri). —

Le système phosphatasique du thymus. — *Montpellier, Imp. de la Charité, 1945, 8 courbes, 132 p. in-8°.*

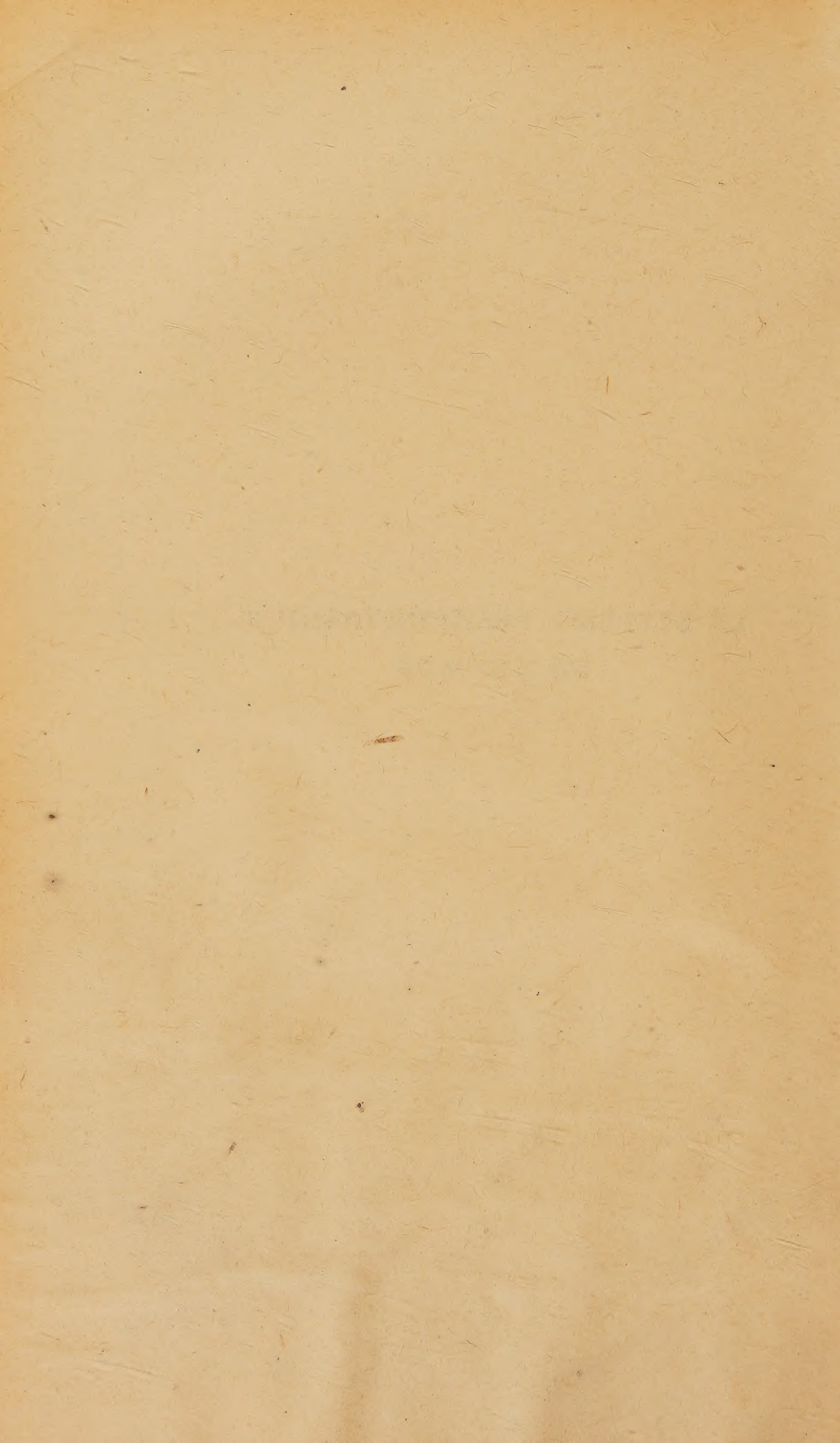
(Thèse Pharm., Montpellier, 1945, n° 310.)

SOUCHE (Henri). —

Le système phosphatasique du thymus. — *Montpellier, Imp. de la Charité, 1945, 8 courbes, 132 p. in-8°.*

(Thèse Pharm., Montpellier, 1945, n° 310.)

LE SYSTÈME PHOSPHATASIQUE DU THYMUS



Le système phosphatasique du Thymus

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier

le Mars 1945

PAR

HENRI SOUCHE

Pharmacien

Licencié ès sciences physiques

Ex-préparateur à la Faculté de Pharmacie

Lauréat de la Faculté de Pharmacie

Médaille d'argent

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(MENTION : PHARMACIE)

JURY	{	MM. A. ASTRUC, Doyen, <i>Président</i> .	{	<i>Assesseurs.</i>
		E. CANAIS, Professeur.		
		R. GRANGER, Chargé de Cours.		

MONTPELLIER

IMPRIMERIE DE LA CHARITÉ

1945

Faculté de Pharmacie de Montpellier

ADMINISTRATION

MM.	
A. ASTRUC (O. ✱, I. P. ☞)	Doyen.
E. CANALS (I. P. ☞)	Assesseur.
TOURRETTE (I. P. ☞)	Secrétaire.

PROFESSEURS

MM.	
A. ASTRUC (O. ✱, I. P. ☞)	Phar. galénique et pharmacodynamie.
C. HOLLANDE (I. P. ☞)	Zoologie et micro-biologie.
A. JUILLET (I. P. ☞)	Botanique et matière médicale.
E. CANALS (I. P. ☞)	Physique.
P. JAULMES (A. ☞)	Analyse et Toxicologie.
R. DOLIQUE (A. ☞)	Chimie minérale et Pharmacie industrielle.
J. GIROUX, Professeur sans chaire.	Pharmacodynamie.
R. GRANGER, chargé du cours	Chimie organique et chimie biologique.
P. CASTEL (A. ☞) chargé du cours	Pharmacie chimique.

DOYEN HONORAIRE

M. G. MASSOL (✱, I. P. ☞, ☜)

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	
M. MOUSSERON, (A. ☞) professeur à la Faculté des Sciences.	
A. FAUCON (O ✱, I. P. ☞) ☜, C GO ☜)	

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	
A. JUILLET (I. P. ☞)	Botanique.
E. CANALS (I. P. ☞)	Hydrologie.
P. JAULMES (A. ☞)	Toxicologie.
R. DOLIQUE (A. ☞)	Pharmacie industrielle.
R. GRANGER	Chimie organique.
J. GIROUX	Physiologie.
J. SUSPLUGAS	Cryptogamie et Zoologie.
L. ASTRUC	Législation pharmaceutique.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	
L. FARRÉ (I. P. ☞)	Chimie et Pharmacie.
J. SUSPLUGAS	Histoire naturelle.
R. MARIGNAN	Chimie..

NOTA. — La Faculté de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui sont présentées.



A LA MÉMOIRE DE MA GRAND'MÈRE

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A MON FRÈRE LOUIS

A MES FRÈRES ET SŒURS

A MES BELLES-SŒURS ET BEAU-FRÈRE

A MES NEVEUX

A MON AMI HENRI BESSOLES

A MES AMIS AZÉMAR ET FRAUX

A MES CAMARADES DE LABORATOIRE

**A MES CAMARADES
DE L'ASSOCIATION CATHOLIQUE DES ÉTUDIANTS**

A TOUS MES AMIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE DOYEN A. ASTRUC

Professeur de Pharmacie galénique et Pharmacodynamie
Correspondant national de l'Académie de Médecine
Officier de la Légion d'honneur

A MONSIEUR LE PROFESSEUR E. CANALS

Professeur de Physique

A MON MAITRE, MONSIEUR R. GRANGER

Chargé de cours

**A TOUS MES MAITRES
DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE**

AVANT-PROPOS

Au moment de présenter cette thèse, nous prions nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie d'agréer l'hommage de notre reconnaissance.

En acceptant de présider notre jury, Monsieur le Doyen ASTRUC nous a fait l'honneur de la haute autorité scientifique qui s'attache à son nom. Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre gratitude.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur CANALS pour l'accueil si cordial qu'il nous a toujours réservé dans son laboratoire. Durant nos nombreuses visites, nous avons pu apprécier la valeur scientifique et la grande bonté de ce Maître.

Monsieur le Professeur GRANGER, après avoir été l'initiateur de ce travail, nous a permis de mener à bien cette étude. Après nous avoir fait l'honneur de nous choisir comme préparateur, Monsieur le Professeur GRANGER n'a cessé de nous prodiguer ses précieux conseils et nous a toujours témoigné la plus grande bienveillance ; qu'il soit assuré de notre profond attachement.

Nous devons beaucoup à Monsieur le Professeur MOUSSERON, Directeur de l'Institut de Chimie de

Montpellier, qui a guidé nos premiers pas dans la recherche scientifique. Nous avons toujours trouvé auprès de ce Maître de précieux réconforts. Nous sommes heureux de lui témoigner, en cette occasion, notre vive reconnaissance.

Que celui qui nous initia à l'art pharmaceutique trouve ici l'assurance de notre filiale affection.

H. S.

LE SYSTÈME PHOSPHATASIQUE DU THYMUS

INTRODUCTION

Dans la nature, parmi les composés biochimiques, deux groupes constituent un grand réservoir d'énergie : les glucides et les lipides. Ces substances restituent par la suite cette énergie captée, à partir du rayonnement solaire, par la synthèse chlorophyllienne. Ainsi les glucides sont dégradés, soit par la fermentation alcoolique, soit par la contraction musculaire, pour ne citer que les principaux types, et le carbone, qu'ils renferment, se transforme finalement en gaz carbonique :



Les lipides donnent une quantité d'énergie plus grande encore. Sans doute la réaction chimique ne saurait avoir lieu brutalement selon le schéma indiqué ; une telle quantité de chaleur, libérée trop brusquement, amènerait une grande élévation de température et provoquerait une coagulation des protéines, rendant toute vie impossible. Aussi ces réactions se décomposent-elles en une série de dégradations qui mettent en jeu certains produits, tels que l'acide phosphorique et ses dérivés. Des biocatalyseurs permettent d'atteindre rapidement la limite d'équilibre dans chaque cas.

L'acide phosphorique estérifie les fonctions alcools et pseudo-aldehydiques des oses ; les esters, en C_6 , peuvent alors seulement se scinder pour donner d'autres esters en C_3 qui, par la suite, produiront une molécule d'alcool en C_2 et une molécule de CO_2 .

Ainsi les réactions de phosphorylation sont très importantes au niveau de chaque cellule où le glucose est apporté.

Les biocatalyseurs, qui permettent ainsi la vie animale, sont de trois sortes : les vitamines, les hormones et les diastases.

Les *vitamines* sont des composés chimiques relativement simples, où la présence d'azote avait fait penser, dans les premiers temps, que cet élément était un support du caractère vitaminique. La découverte de la vitamine C a permis de redresser cette erreur.

Les *hormones* ont également une structure chimique relativement simple. Les premières ont été découvertes dans les tissus animaux, les vitamines étant localisées surtout chez les végétaux. On a pensé tout d'abord en faire deux classes bien distinctes ; mais la découverte des auxines et des hétéro-auxines dans les végétaux d'une part, et, d'autre part, la synthèse de la vitamine C chez le rat, a permis d'élargir les limites de ces deux classes.

Les *diastases* sont séparées des vitamines et des hormones par la complexité de leur constitution. Ici, ce sont des caractères physico-chimiques qui justifient l'existence de ce groupe. Les diastases ou enzymes sont spécifiques d'une réaction ou d'un type de réaction. On doit distinguer deux grandes classes, les hydrolases et desmolases : les premières comprennent les estérases (lipases, phosphatases et sulfatases), les carbohydrases, les amidases, les protéases ; les deu-

xièmes groupent les déshydrases, les oxydases, les hydratases, les catalases, etc...

Au point de vue structure, les diastases comprennent deux parties : l'une est la codiastase de nature chimique peu complexe, susceptible de dialyser, l'autre, de nature protéinique et colloïdale, est l'apodiastase ; l'union des deux donne l'holodiastase ou holoenzyme.

L'acide phosphorique intervient souvent dans la constitution des codiastases où il est uni, soit directement, à des restes vitaminiques tels que la lactoflavine ou vitamine B₂ et l'aneurine ou vitamine B₁, avec lesquels il forme les acides lactoflavinephosphorique et aneurinepyrophosphorique, soit par l'intermédiaire du ribose dans le cas du coferment nicotinique où il se trouve associé à la vitamine PP et à l'adénine. Il peut exister à l'état d'acides pyrophosphorique ou polyphosphoriques dans le cas de l'acide adénosine-triphosphorique, qui est l'agent principal de la phosphorylation du glucose.

D'autre part, l'acide phosphorique intervient dans la régulation acido-basique du pH du sérum sanguin par le pouvoir-tampon des phosphates mono ou bimétalliques avec les protéines et les carbonates. Il agit sur la formation des os et son métabolisme est étroitement lié à celui du calcium. Il intervient également dans le métabolisme des lipides sous forme de phospholipides et de phosphoaminolipides ou phosphatides, et dans celui des protéines, dans le cas des nucléoprotéines.

Le nombre de corps chimiques, faisant intervenir l'acide phosphorique, montre l'intérêt que présentent les diastases susceptibles de le libérer. Aussi, après les avoir rapprochées tout d'abord des enzymes, agissant sur la fonction ester, les estérases, on pense actuel-

lement les séparer de cette classe de diastases pour en faire un groupe particulier, celui des **phosphatases** : elles contiennent en effet non seulement des estérases, scindant les esters phosphoriques en acide orthophosphorique et en alcools ou phénols, mais encore des diastases susceptibles d'hydrolyser des composés minéraux, comme le pyrophosphate de sodium, et même d'hydrater le métaphosphate de sodium.

Les premières recherches sur ces diastases furent faites par les biologistes japonais SUZUKI, YASHIMURA et TAKAISHI (1), en 1907, sur certaines céréales qui libéraient, à partir de la phytine ou inositolhexaphosphate de calcium et de magnésium, de l'acide orthophosphorique. D'autres auteurs les découvrirent ensuite dans les règnes végétal et animal. Vers 1920, ROBISON et KAY cherchèrent à obtenir ces diastases à l'état pur ; bien que jusqu'à maintenant cette tentative n'ait pas été réalisée, l'étude des phosphatases a énormément progressé au cours de ces dernières années.

De nombreux travaux ont permis de fixer les conditions d'action de ces enzymes au point de vue température, pH, etc..., et de connaître leur mode d'action dans les processus physiologiques. Les variations de température et de pH influent en effet d'une manière considérable sur l'activité et la stabilité de ces substances. Actuellement, la plupart des tissus animaux et végétaux ont été étudiés et dans tous, sauf de rares exceptions, on a trouvé, avec des activités essentiellement variables, des phosphatases.

Au point de vue médical, les phosphatases ont

(1) SUZUKI, YASHIMURA et TAKAISHI. — *Imp. Univ. Coll. Agrée. Bull.*, Tokio, 1907, 7, 503.

montré un intérêt pratique indéniable. Les mesures de phosphatasémie tendent à se généraliser et des unités d'activité phosphatasique ont été établies : Unités Roberts, Unités Bodansky, Unités Kay. Malheureusement ces unités ne sont pas comparables entre elles et il serait souhaitable qu'une Unité Internationale fût définie.

Dans les maladies osseuses, la phosphatasémie rend de très grands services : en effet, dans le rachitisme, elle augmente avant même que les lésions n'aient pu être décelées par radiographie. Dans l'ostéite déformante de Paget, elle atteint 5 à 8 fois la valeur normale ; dans certains cas elle atteint même 20 fois cette valeur. En pathologie hépatique, l'hyperphosphatasémie est marquée dans l'ictère par rétention alors qu'elle est peu nette dans l'ictère infectieux. Enfin, chez les cancéreux, on note une hyperphosphatasémie.

Ce bref résumé nous montre l'intérêt des activités phosphatasiques dans les différents tissus. La plupart des organes animaux ont été étudiés dans le domaine phosphatasique ; toutefois certains, tels que le thymus, n'ont pas paru retenir l'attention des chercheurs malgré l'intérêt qu'ils présentent dans les métabolismes. Le thymus, glande à sécrétion interne, est également un organe lymphopoïétique ; la production de leucocytes fait jouer un grand rôle aux phosphatases dans la synthèse des composés chimiques qui constituent ces éléments sanguins.

C'est pourquoi Monsieur le Professeur GRANGER nous en a confié l'étude afin de comparer les phénomènes enzymatiques de cet organe aux nombreux systèmes phosphatasiques décrits, ces dernières années, en particulier par Monsieur le Professeur ROCHE, de

la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille, et ses collaborateurs.

Nous nous sommes donc attaché dans notre travail à l'étude du système phosphatasique du thymus. Après un exposé général sur les phosphatases, nous décrivons les méthodes employées en vue de la recherche des phosphatases du thymus ; à cette partie, purement analytique, fait suite le résultat de nos recherches personnelles. En dernier lieu, nous confrontons les résultats obtenus, avec ceux indiqués par les différents auteurs, à propos du système phosphatasique d'autres organes.

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR LES PHOSPHATASES

La place qu'occupent les phosphatases dans les phénomènes vitaux apparaît chaque jour plus importante. Leur large distribution les a fait reconnaître des biologistes qui ont cherché à les extraire, les purifier, à étudier leurs propriétés et qui sont parvenus à les classer; sans toutefois les isoler, ils ont pu émettre quelques hypothèses sur leur constitution chimique, les notions d'isodynamie et leur action vis-à-vis des différents effecteurs (1).

A) Extraction et purification des phosphatases.

L'extraction elle-même des phosphatases ne présente pas de grandes difficultés, toutefois elle n'est jamais quantitative. L'extraction par l'eau et les solutions-tampons est en particulier assez facile; elles sont en effet hydrosolubles. Les plus solubles, dans ce véhicule,

(1) La plupart des renseignements de notre bibliographie ont été relevés à partir des thèses de COURTOIS (J.), Mlles BAUDOIN (J.), LAURENS (A.), LATREILLE (M.), de LAROMIGUIÈRE (S.) et DURAND (J.).

constituent les lyoenzymes, les autres correspondent aux desmoenzymes. Le fait que les milieux de culture des micro-organismes et des bactéries sont riches en phosphatases, permet de comprendre que la mise en solution de ces dernières puisse se faire aisément ; on n'obtient toutefois qu'une faible fraction de l'enzyme si on ne procède pas, tout d'abord, à l'autolyse du contenu cellulaire. C'est pourquoi les organes sont tout d'abord broyés en milieu aqueux (1) et le développement microbien est inhibé grâce à la présence d'antiseptiques. On abandonne ensuite ces macérations pendant un temps plus ou moins long, suivant le degré désiré d'autolyse. On procède enfin à leur purification basée sur les deux principes généraux suivants :

a) Le premier consiste à éliminer les impuretés du milieu naturel (2), les impuretés les plus abondantes étant les protéines. C'est pourquoi on a cherché à s'en débarrasser en les précipitant. Ce procédé entraîne malheureusement une précipitation partielle des enzymes et n'est guère utilisable dans le cas des produits riches en protéines. Il faut dénaturer ces dernières par l'addition de solvants organiques, tels que le mélange alcool-éther (3) ou l'acétone qui précipitent en même temps les protéines et les enzymes. Le précipité séché, puis traité par l'eau, ne libère plus que les enzymes, les protéines ainsi dénaturées restant insolubles. Ainsi ALBERS H. et ALBERS E. (4) ont obtenu, à partir du rein, un autolysat riche en phosphatases, en opérant en présence d'acétate d'éthyle et de toluène.

(1) BAMANN, RIEDELS et DIEDERICHs. — *Z. Physiol. Chem.*, 1934, **230**, 175.

(2) AZAKAWA (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1928, **10**, 157.

(3) MARTLAND (M.) et ROBISON (R.). — *Biochem. J.*, 1927, **21**, 666.

(4) ALBERS (H.) et ALBERS (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **232**, 189.

L'addition d'alcool à ce milieu précipite en même temps protéines et enzymes. Un traitement ultérieur par l'eau mettra en solution uniquement les phosphatases.

b) Le deuxième principe consiste à isoler les enzymes de leurs milieux naturels par des procédés d'adsorption ; les méthodes les plus satisfaisantes, décrites par WILLSTÄTTER, sont basées sur la technique par adsorption spécifique soit des enzymes, soit de leurs impuretés. Les adsorbants utilisés sont nombreux : EHRENSWARD (1), par exemple, libère l'enzyme par digestion tryptique du tissu et adsorbe ensuite les impuretés sur de l'acide stéarique. Cette méthode a été très utilisée par l'école japonaise, ainsi que par Monsieur le Professeur ROCHE. Elle est très intéressante parce que, généralement, le pH optimum d'action est modifié, ce qui prouve que l'enzyme n'est pas à l'état libre mais complexé. Peut-être l'adsorption sépare-t-elle l'enzyme, des corps qui l'inactivent ? Cette méthode très délicate exige des pH bien définis d'adsorption et d'élution. Toutefois, elle n'est pas quantitative et ne permet pas l'obtention de produits très actifs. Par ce procédé on a cherché à séparer les différentes diastases entre elles.

Dès 1926, NEUBERG et WAGNER firent la preuve de l'existence d'une phosphomonoestérase différente d'une pyrophosphatase, spécifiques l'une et l'autre, de leurs substrats respectifs. TAKAHASHI (2) sépare la phosphomonoestérase A_1 , de la pyrophosphatase par adsorption de cette dernière sur de l'hydroxyde ferrique.

(1) EHRENSWARD. — *Z. Physiol. Chem.*, 1933, **217**, 274.

(2) TAKAHASHI (H.). — *J. Biochem. Japan*, 1932, **16**, 447.

Malgré leurs répartitions parallèles et leurs pH optima analogues — sauf pour les phosphatases alcalines — tous les travaux tendent à montrer la différenciation des deux types d'enzymes : acido-résistances différentes, liaisons aux cellules plus ou moins grandes, résistances à la chaleur variables. Aussi étudierons-nous la possibilité de séparation des deux classes d'enzymes. Nous examinerons successivement trois techniques d'isolement : l'adsorption, la destruction thermique et la séparation par les ions H^+ et OH^- .

KURATA (1) isole la pyrophosphatase du rein par adsorption de l'autolysat légèrement alcalin sur de l'hydroxyde de magnésium ; le liquide résiduel, en milieu acide, hydrolyse seulement les pyrophosphatases ; TAKAHASHI (2) utilise également cette méthode en présence de kaolin ; ROCHE, Mlle LAURENS et Mlle de LAROMIGUIÈRE (3) emploient le cholestérol pour adsorber la pyrophosphatase d'une préparation de phosphomonoestérase de muqueuse intestinale. BAUER (4) utilise l'alumine $C\gamma$.

Par destruction thermique, BAUER a pu séparer la pyrophosphatase, de la levure basse qui, placée dans les mêmes conditions, serait plus résistante à la chaleur que la monoestérase. Cependant ROCHE, Mlle LAURENS et Mlle de LAROMIGUIÈRE ont essayé cette méthode pour séparer la pyrophosphatase de la phosphomonoestérase, mais sans succès.

La séparation par l'action des ions H^+ et OH^- a permis à BAMANN et GALL (5), d'isoler la pyrophos-

(1) KURATA (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1931, **14**, 25.

(2) TAKAHASHI (H.). — *J. Biochem. Japan*, 1932, **16**, 463.

(3) ROCHE (J.), Mlle LAURENS (A.) et Mlle de LAROMIGUIÈRE (S.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 1157.

(4) BAUER (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **239**, 195.

(5) BAMANN (E.) et GALL (H.). — *Biochem. Z.*, 1937, **293**, 1.

phatase très acide, en maintenant à 9 le pH de l'extrait ammoniacal de foie pendant 24 heures à l'étuve à 37°. Ce traitement fait disparaître les phosphomonoestérases ; en revenant en milieu acide, la pyrophosphatase alcaline est détruite et la préparation obtenue est riche en pyrophosphatase acide de pH optimum 5,5.

Il convient toutefois de ne pas attribuer à l'un de ces tests une valeur trop absolue, car le mécanisme de destruction des enzymes n'est pas encore entièrement connu.

B) Classification des phosphatases.

Comme les enzymes, dont elles constituent un groupe important, les phosphatases sont spécifiques des substrats hydrolysés d'où la classification de FOLLEY et KAY (1) qui distinguent les groupes suivants :

1°) Les *phosphomonoestérases* qui libèrent l'acide orthophosphorique, à partir des monoesters phosphoriques, quelle que soit la nature des alcools ou des phénols.

2°) Les *phosphodiesterases* qui hydrolysent une seule liaison du diester phosphorique, le transformant ainsi en monoester ; l'hydrolyse de la deuxième liaison exige l'intervention d'une phosphomonoestérase.

Il n'a pas été encore trouvé de phosphotriestérase.

3°) Les *pyrophosphatases* qui agissent sur les pyrophosphates métalliques et les esters pyrophosphoriques et libèrent, dans le cas des pyrophosphates, deux molécules d'orthophosphate et, dans le cas des esters pyrophosphoriques, une molécule d'orthophosphate et une de monoesterphosphorique.

(1) KAY (H-D.). — *Physiol. Rev.*, 1932, 12, 384.

4^o) Les *métaphosphatases* qui hydratent les métaphosphates en donnant des sels de l'acide orthophosphorique. Il est à noter que ces enzymes agissent seulement sur des substrats minéraux.

5^o) Les *phosphoamidases* qui hydrolysent les amides phosphoriques en acide orthophosphorique et en bases azotées.

6^o) Un dernier groupe comprend toutes les phosphatases ne rentrant pas dans les classes précédentes et dont la spécificité est réduite à un seul substrat. Ce groupe comprend :

Les *phytinases*, la *lecithinase*, l'*adénylpyrophosphatase*, l'*hexosediphosphatase*, les *polyphosphatases*, la *polynucleotidase* et la *5-nucléotidase*.

Ce groupe ne saurait être admis sans réserve ; le cas de l'*adénylpyrophosphatase*, si la spécificité de celle-ci venait à se confirmer, constituerait, dans le domaine des pyrophosphatases, une exception où le reste nucléotidique semblerait modifier la spécificité de l'enzyme (1).

Les phosphomonoestérases. — Parmi les phosphomonoestérases, FOLLEY et KAY ont pu séparer quatre types principaux définis en se basant sur le pH optimum d'action, leur aptitude préférentielle à dédoubler l'un des isomères α ou β de l'acide glycérophosphorique et sur leur sensibilité vis-à-vis de l'ion Mg^{++} .

La *phosphomonoestérase* A_1 dite « alcaline » (pH optimum 8,9-9,2) hydrolyse le β -glycérophosphate préférentiellement à l' α -glycérophosphate. Elle est activée par le magnésium.

(1) ROCHE (J.), NGUYEN VAN THOAI et Mlle DURAND (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, 25, 1166.

CLOETENS (1) la subdivise en deux phosphomonoestérases A_1 I et A_1 II qu'il définit par l'action du cyanure de potassium concurremment avec celle du magnésium : la phosphomonoestérase A_1 I, inactive en l'absence de magnésium, n'est pas influencée par le cyanure de potassium en présence de magnésium ; la phosphomonoestérase A_1 II, renforcée seulement par le magnésium, est totalement inhibée par le cyanure de potassium en présence de magnésium.

La phosphomonoestérase A_2 dite « acide » (pH optimum 5,3-5,8) dédouble le β -glycérophosphate préférentiellement à l' α -glycérophosphate. Son action est peu sensible vis-à-vis du magnésium et même, dans certains cas, elle est insensible.

La phosphomonoestérase A_3 dite « très acide » (pH optimum 3-4) voit son activité varier suivant les isomères α et β du glycérophosphate, elle est inhibée par le magnésium ; essentiellement d'origine végétale (son de riz, champignons) (2), on la rencontre également dans des organes animaux (BAMANN) (3).

La phosphomonoestérase A_4 (pH optimum 6-6,4) hydrolyse plus rapidement l'isomère α que l'isomère β du glycérophosphate ; elle est activée par le magnésium. Elle a été étudiée par ROCHE (4) ; c'est une des phosphatases des hématies, elle se trouve également dans les levures basses (5).

Cette classification n'est qu'approximative car en fait le pH optimum d'action varie dans des limites plus larges : ainsi la phosphomonoestérase A_4 varie

(1) CLOETENS (R). — *Enzymologia*, 1939, **6**, 46.

(2) NGUYEN VAN THOAI. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, **23**, 1183.

(3) BAMANN (E.) und SALZER (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, **286**, 147.

(4) ROCHE (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, **13**, 841.

(5) SCHAFFNER (A.) und BAUER (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **232**, 66.

de 5,4 (1) à 6,4 (2) ; il varie également suivant la présence d'inhibiteurs naturels accompagnant l'enzyme (3) et par des purifications successives ; KOBAYASHI (4) et INOUE (5) indiquent pour la takadiastase un pH optimum voisin de 3, alors que les préparations non purifiées ont un pH optimum de 5,5.

Le magnésium peut être sans action sur la phosphomonoestérase A_3 (6) ou l'inhiber ainsi que la phosphomonoestérase A_2 (7). Enfin l'action préférentielle vis-à-vis de l' α ou du β -glycérophosphate ne constitue pas un caractère absolu et peut être altérée au cours de l'extraction ou de la dialyse. D'après COURTOIS (8), la phosphomonoestérase A_2 dédouble plus rapidement l' α que le β -glycérophosphate dans les feuilles d'aman-dier alors que, d'après BAMANN, le phénomène inverse serait observé dans les tissus animaux.

Les phosphodiéstérases. — Les phosphodiésteres exigent l'intervention de deux enzymes pour la libération totale de l'acide orthophosphorique : en effet, les phosphomonoestérases ne peuvent pas agir sur une liaison du phosphodiéster, puis sur la seconde, car ces deux liaisons sont solidaires. Il faut que la phosphodiéstérase ait déjà scindé le phosphodiéster en un phosphomonoester et un alcool ou un phénol pour que la phosphomonoestérase puisse réagir à son tour sur le phosphomonoester formé et le scinder en ses cons-

(1) HASHIMOTO (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1937, **26**, 137.

(2) ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — *Enzymologia*, 1939, **7**, 278.

(3) BAMANN (E.) und SALZER (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, **286**, 147.

(4) KOBAYASHI (H.). — *J. Biochem. Japan*, 1927, **8**, 205.

(5) INOUE (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1927, **7**, 433.

(6) BAMANN (E.) und SALZER (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, **288**, 299.

(7) DAVIES (R.-D.). — *Biochem. J.*, 1934, **28**, 529.

(8) COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 1376.

tituants. Ceci est demeuré longtemps assez vague et incertain par suite du fait que, dans la plupart des cas, la phosphodiesterase est accompagnée d'une phosphomonoesterase. UZAWA (1) a cherché, sans succès, à obtenir, par des méthodes d'adsorptions spécifiques, une phosphodiesterase dépourvue de phosphomonoesterase ; par contre, il obtint des venins de serpents contenant seulement une phosphodiesterase de pH optimum 8,6, pure. Les phosphodiestérase comprennent, elles aussi, plusieurs types : HOTTA (2) a étudié la libération de l'acide orthophosphorique par les phosphodiestérase du rein et a obtenu deux pH optima, 5 et 7,8. Enfin UDAGAWA (3) signale deux types de phosphodiestérase dans les organes animaux : l'une à pH optimum 9 comme celle des venins de serpents, l'autre à pH optimum voisin de 5,5.

Les pyrophosphatases. — Pour TAKAHASHI (4) et MUNEMURA (5), il y aurait trois pyrophosphatases de pH optima : 3,8-4, 5,2-5,5 et 8. Les deux premières paraissent exister aussi bien dans les tissus végétaux qu'animaux (6-7-8). Seule, la dernière, de pH optimum 8, n'est retrouvée que chez les animaux où sa répartition semble liée à celle de la phosphomonoesterase A_1 . BAUER a décrit une pyrophosphatase de pH optimum 6,4 dans les levures. Malgré tout leur présence n'appar-

(1) UZAWA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1932, **15**, 11.

(2) HOTTA. — *J. Biochem. Japan*, 1934, **20**, 345.

(3) UDAGAWA. — *J. Biochem. Japan*, 1935, **22**, 2.

(4) TAKAHASHI (H.). — *J. Biochem. Japan*, 1932, **16**, 447.

(5) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.

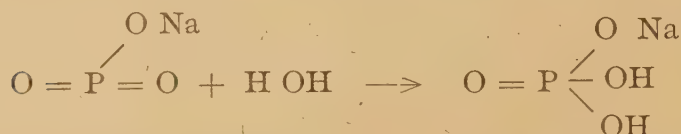
(6) COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 1376.

(7) ROCHE (J.), NGUYEN VAN THOAI et Mlle DURAND (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 1166.

(8) BAMANN (E.) et GALL (H.). — *Biochem. Z.*, 1937, **293**, 1.

raît pas toujours sur les préparations brutes, mais on peut les mettre en évidence en faisant intervenir des actions d'effecteurs (1).

Les métaphosphatases. — Découvertes par KITASATO (2) dans la levure puis dans les extraits de rein et de foie, elles possèdent la propriété d'hydrater les métaphosphates en orthophosphates :



Les métaphosphatases sont les seuls enzymes susceptibles d'agir sur des substrats inorganiques n'existant pas dans les cellules.

Les phosphoamidases. — L'hydrolyse des amides phosphoriques telles que la phosphocréatine, la phosphoarginine, semble due à des enzymes spécifiques. ICHIHARA (3) a pu les préparer à partir des extraits de rein et les séparer de la phosphomonoestérase.

C) Constitution des phosphatases.

D'après les hypothèses de G. BERTRAND, de WILLS-TÄTTER et de Von EULER, les enzymes semblent formés de deux constituants : le coenzyme et l'apoenzyme qui, unis, donnent l'holoenzyme. Le coenzyme est généralement de nature simple et de poids moléculaire relativement peu élevé permettant ainsi sa dialyse. Porteur de groupements actifs qui sont, soit des restes de vitamines (amide nicotinique, aneurine,

(1) ROCHE (J.), NGUYEN VAN THOAI et Mlle DURAND (J.). — Loc. cit.

(2) KITASATO. — *Biochem. Z.*, 1928, **197**, 257.

(3) ICHIHARA. — *J. Biochem. Japan*, 1933, **18**, 87.

etc...), soit des métalloporphyrines (cytochromes), il contient souvent un métal à valence variable (fer,...). De nature protéinique, l'apoenzyme participe à la fixation du substrat et c'est sur les modifications de son activité que repose l'action de certains inhibiteurs.

Dans quelques cas, l'holoenzyme a pu être isolé à l'état pur. Cependant, il ne l'a jamais été dans le cas des phosphatases dont la constitution a été étudiée par des voies détournées par ALBERS et ses collaborateurs (1), dont voici les principaux résultats : l'enzyme ou holophosphatase se forme par une réaction d'équilibre entre un constituant de faible poids moléculaire, la cophosphatase, groupement actif ou porteur de groupements actifs et l'apophosphatase, protéine spécifique de poids moléculaire élevé :



Par une dialyse prolongée et à un pH donné, on peut en effet éliminer la cophosphatase, du milieu qui devient de moins en moins actif par suite de la dissociation continue ; l'apophosphatase, seule, étant inactive, ceci justifie la réaction dans le sens 1. Cependant, pour un pH bien déterminé différent du précédent, l'addition de cophosphatase provenant de la dialyse d'une autre holophosphatase, permet la réactivation de l'apophosphatase et la formation d'une nouvelle holophosphatase, prouvant ainsi la réalité de la réaction 2. Dans le milieu naturel les trois éléments coexistent et l'équilibre s'établit entre la synthèse et la dégradation, équilibre conditionné par divers facteurs, notamment le pH. De même, un coferment

(1) ALBERS (H.), BEYER (E.), BOHNEMKAMP (A.) und MULLER (G.). — *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1938, **71**, 1913.

peut donner plusieurs holophosphatases en faisant varier le pH et en le mettant en présence de plusieurs apophosphatases différentes. On peut établir des courbes de stabilité pour chaque holophosphatase (1) et, suivant le pH du milieu, on obtiendra la formation d'un nouvel holoenzyme. De véritables cycles seront ainsi réalisés : si on prend, par exemple, la phosphatase alcaline rénale qui s'inactive rapidement aux pH 5-6 et la phosphatase acide de la levure haute de pH optimum 4, s'inactivant entre les pH 6-8 et les pH 1,5-3,2, on constate que l'holoenzyme de la levure haute, mis aux pH alcalins en présence de l'holoenzyme rénal, perd son coferment qui s'unit à l'apophosphatase rénale pour donner une holophosphatase rénale. De même cette diastase formée, mise aux pH acides en présence de l'holoenzyme de la levure haute, cède son coferment à l'apoenzyme de la levure, pour redonner l'holophosphatase de la levure.

Ces expériences nous prouvent que, dans les règnes végétal et animal, les coenzymes sont identiques. Le déplacement d'un coferment d'une apophosphatase sur l'autre rend difficile le problème de leur préparation à l'état pur, surtout lorsqu'on se trouve en présence de plusieurs phosphatases isodynames.

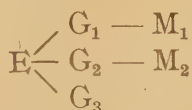
On peut reconstituer une holophosphatase à partir de ses éléments : en effet, par simple addition du dialysat avec le liquide dialysé, on voit se rétablir rapidement l'activité diastasique (2). Il semble que la seule addition de magnésium ne réactive pas l'apoenzyme, toutefois, si on réunit les deux constituants,

(1) ALBERS (H.). — *Handbuch der Enzymologie Akad. Verlag. Leipzig*, 1940, p. 1545.

(2) ALBERS (D.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1939, **261**, 43.

le produit obtenu voit parfois son activité augmenter en présence du magnésium qui agirait seulement sur l'holoenzyme. Le magnésium serait un activateur (ERDTMANN) (1) et non un coferment (KAY) (2).

Les travaux de CLOETENS (3), sur la constitution des phosphatases et leur inhibition, permettent à cet auteur d'arriver aux conclusions suivantes : schématiquement les enzymes seraient représentées par un groupement protéique E sur lequel seraient fixés plusieurs groupements actifs $G_1, G_2, \dots$ qui seraient bloqués par des métaux M_1 et M_2 (4). M_1 peut être un des cations suivants : Ca^{++} , Mg^{++} , Co^{++} , Ni^{++} ou Mn^{++} , susceptibles d'être détachés du groupement G_1 par dialyse, en présence de carbonate acide de sodium, les cations suivants : Zn^{++} , Co^{++} , Hg^{++} que CLOETENS désigne sous le terme général de M_2 bloquant les groupements G_2 . La dialyse, contre une solution alcaline (pH = 9) de cyanure de potassium centimolaire, permet de détacher M_2 . A l'inverse de G_1 et de G_2 , un groupement G_3 serait libre (5) et, son blocage par un métal, amènerait une perte d'activité d'où le schéma suivant :



Si M_2 est éliminé par suite de dialyse en présence de cyanure de potassium, M_1 se fixe non seulement sur G_1 mais également sur G_2 .

(1) ERDTMANN. — *Z. Physiol. Chem.*, 1927, **172**, 182.

(2) KAY (H-D.). — *Biochem. J.*, 1928, **22**, 1446.

(3) CLOETENS (R.). — *Biochem. Z.*, 1941, **307**, 352.

(4) CLOETENS (R.). — *Biochem. Z.*, 1941, **308**, 37.

(5) CLOETENS (R.). — *Biochem. Z.*, 1941, **310**, 42.

Les cyanures, ainsi que les fluorures, peuvent former des complexes avec les métaux de l'enzyme, qui peuvent être soit trivalents, comme le Fe^{+++} et le Mn^{+++} , soit divalents comme le Mg^{++} . D'après ces théories, MASSART et DUFAIT (1) expliquent l'inhibition des diastases par ces ions. Dans le cas du cyanure de potassium, l'hydroxylamine et la semicarbazide sont sans action, ce qui permet de rejeter l'hypothèse d'un blocage des fonctions aldehydique ou cétonique et de rapporter cette action à l'élimination des métaux.

Le fluorure de sodium, tout en restant inhibiteur, donne des résultats variables : ceci est dû à la présence comme métal M_1 soit de Mg^{++} , soit de Co^{++} ou de Zn^{++} ; l'ion fluor, en effet, s'unit plus facilement avec Mg^{++} qu'aux autres métaux d'où la distinction suivante : les phosphatases-Mg, parmi lesquelles on peut noter la phosphatase de la levure et qui sont inhibées par l'ion fluor, les phosphatases-Co, inhibées par l'ion cyanogène qui forme un complexe avec le cobalt, les phosphatases-Zn, inhibées par l'hydrogène sulfuré et parmi ces dernières, la phosphatase rénale.

Cependant bien des contradictions subsistent encore sur la constitution des phosphatases. Elles sont vraisemblablement dues aux déplacements des coferments et aux modifications des apoferments.

Les enzymes isodynates auraient un coenzyme commun et chacun d'entre eux serait caractérisé par un apoenzyme particulier. On trouve ainsi plusieurs phosphomonoestérases isodynates, plusieurs diestérases isodynates et pyrophosphatases isodynates.

(1) MASSART (L.) und DUFAIT (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1942, **272**, 157

D) Les effecteurs.

Il est une dernière notion d'enzymologie qui présente une grande importance : c'est la notion d'effecteurs. On entend par *effecteurs*, des corps qui, mis en présence d'un enzyme donné, augmentent ou diminuent, parfois même arrêtent totalement, son activité. Quand ils augmentent cette activité, on a affaire à des *activateurs*, dans le cas contraire ce sont des *inhibiteurs*.

La fonction d'activateur ou d'inhibiteur ne saurait être rapportée à un corps donné ; en effet certains éléments, comme le Mg^{++} , activent fortement la phosphomonoestérase A_1 , alors qu'ils inhibent un enzyme isodyname comme la phosphomonoestérase A_3 ; bien plus, dans certains cas, un enzyme est insensible, inhibé ou activé, par un même élément suivant que cet enzyme a été retiré de tel organe ou de tel autre. L'acide cholique, sans action sur la pyrophosphatase alcaline A_1 de l'intestin, est inhibiteur de l'enzyme du rein (1).

L'activation ou l'inhibition dépend parfois simplement de la concentration de l'élément dans la macération. Le magnésium, qui est activateur de la phosphomonoestérase A_1 , peut en devenir inhibiteur si la concentration devient trop élevée. Par ailleurs, si la concentration devient trop faible, l'activation baissera. Il y a donc une concentration optima pour laquelle l'activation passe par un maximum. En déterminant une notion de $q [Mg]$, parallèle à celle de pH, on définit cette concentration.

(1) ROCHE (J.), Mlles de LAROMIGUIÈRE (S.) et LAURENS (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 1157.

$q [Mg^{++}]$ est égal à $-\log [Mg^{++}]$. La concentration $[Mg^{++}]$ est définie en molarité et non en normalité. Ainsi une solution de SO_4Mg M/100 aura un $q [Mg^{++}]$, (que l'on peut écrire aussi $q Mg$) égal à $-\log \frac{1}{100} = 2$: le $q Mg$ ne comprend que le magnésium réellement électropositif, de même que le pH ne comprend que l'hydrogène H^+ électropositif.

Le $q Mg$ optimum dépend de chaque organe et de chaque enzyme. Une notion semblable peut être envisagée également pour le Mn^{++} , le Zn^{++} et tous les autres effecteurs. L'action des effecteurs peut s'exercer soit sur le coferment, soit sur l'apoferment. Elle se manifeste selon des modalités diverses, ainsi que l'ont montré BERSIN (1), COURTOIS (2) et FLEURY (3). On appelle activateurs ou inhibiteurs « absolus » ceux qui exercent leur action indépendamment de la concentration en substrat dans le milieu. Dans ce cas, il y aurait une combinaison de l'effecteur avec le coenzyme dont il augmenterait ou diminuerait l'activité. Quant aux effecteurs « concurrents », on admet que leur action se fait sur les apoenzymes ; l'effecteur ou le substrat se fixeraient sur l'apophosphatase et cela à des concentrations respectives liées l'une à l'autre. Selon les concentrations relatives de substrat et d'effecteur, il y a concurrence entre les combinaisons substrat-phosphatase et effecteur-phosphatase. Cependant, ceci reste hypothétique, car les apophosphatases, comme toutes les protéines, ont des structures encore mal connues.

-
- (1) BERSIN (T.). — *Kürzes Lehrbuch der Enzymologie*, Akad. Verlagsges., éd. B. H., Leipzig, 1938.
(2) COURTOIS (J.). — *Thèse Doctorat Sc. phys.*, Paris, 1938.
(3) FLEURY (P.). — *Exposés de biochimie médicale*, 1939, p. 83.

Nous allons passer en revue les principaux effecteurs et donner sur chacun d'eux quelques détails.

Le principal effecteur est l'ion Mg^{++} . Il représente même un des éléments de base de la classification des phosphatases ; son action est particulièrement nette et a été découverte par ERDTMANN (1), en étudiant la phosphomonoestérase rénale. JENNER et KAY (2), par la suite, découvrirent l'existence d'une concentration optima qui permet d'édifier la notion de q Mg que nous avons exposée précédemment. BAMANN, RIEDEL et DIEDERICHS (3) ont montré que le magnésium activerait plus fortement les lyoenzymes que les desmoenzymes. L'ion Mg^{++} aurait tendance à se fixer sur des constituants cellulaires plutôt que sur les phosphatases.

Pour CLOETENS (4), MASSART et DUFAIT (5) et BAMANN (6), le manganèse serait un activateur de la phosphomonoestérase A_1 . BAMANN le considère comme un activateur plus puissant que le magnésium ; CLOETENS pense qu'il doit même être considéré comme un constituant de l'enzyme. Le calcium serait légèrement activateur des phosphatases ; pour certains auteurs son action serait nulle (3-7). Le fer, le nickel et le cobalt peuvent être activateurs, mais plus faibles, de la phosphomonoestérase A_1 .

Le zinc semble inhibiteur des phosphatases. Cepen-

(1) ERDTMANN. — *Z. Physiol. Chem.*, 1927, **172**, 182.

(2) JENNER (H-D.) and KAY (H-D.). — *J. Biol. Chem.*, 1931, **93**, 733.

(3) BAMANN (E.), RIEDEL (R.) et DIEDERICHS (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1934, **230**, 175.

(4) CLOETENS (R.). — *Naturw.*, 1939, **27**, 806 ; 1940, **1**, 392.

(5) MASSART (L.) und DUFAIT (R.). — *Naturw.*, 1939, **27**, 810 ; 1940, **1**, 393.

(6) BAMANN (E.). — *Naturw.*, 1940, **28**, 142 ; *ibid.* 3405.

(7) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.

dant, en présence d'acides aminés, il peut former un couple activateur sur la phosphomonoestérase A_1 de l'intestin ainsi que l'ont montré HOVE, ELVEHJEM et HART (1). Dialysée, une préparation de muqueuse intestinale sera nettement inhibée par le zinc ; les acides aminés exercent un effet réduit d'activation. Unis, le zinc et les acides aminés ont une action activatrice beaucoup plus puissante. Le zinc paraît être activateur des pyrophosphatases isodynames selon les organes, HORII (2) signale cet effet assez constant sur la phosphatase alcaline.

Parmi les anions effecteurs, nous citerons, tout d'abord, l'ion fluor dont l'effet inhibiteur fut mis en évidence par INOUE (3) par l'action des fluorures alcalins sur les phosphatases acides ; KAY (4) a étendu cette observation aux phosphatases alcalines. La phosphatase alcaline du cerveau et celle des hématies sont inhibées par les fluorures alors que leur action serait nulle sur la pyrophosphatase alcaline. L'ion cyanogène, considéré comme sans action par certains auteurs (ROBISON), s'est révélé inhibiteur pour d'autres ; toutefois CLOETENS a trouvé en lui un instrument capable de subdiviser en deux groupes la phosphomonoestérase alcaline A_1 . MASSART et DUFAIT (5) ont montré son action inhibitrice sur la phosphatase du rein et des levures, probablement par formation de complexes avec des métaux des coenzymes. BARRENS-

(1) HOVE (E.), ELVEHJEM (C-A.) and HART (E-B.). — *J. biol. Chem.*, 1940, **134**, 425.

(2) HORII. — Cité d'après OPPENHEIMER (C.) : *Die Fermente und ihre Wirkungen*. Supplement, Lief 1 et 2, W. Junk, éd., La Haye. 1935, 98-170.

(3) INOUE (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1928, **10**, 133.

(4) KAY (H-D.). — *Biochem. J.*, 1928, **22**, 855.

(5) MASSART (L.) und DUFAIT (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1942, **272**, 157.

CHEN et LANG (1) le signalent comme inhibiteur de la phosphatase A_1 .

L'action de l'ion oxalique fut constatée par MUNEMURA sur les phosphomonoestérases et pyrophosphatases rénales. C'est un effecteur puissant des phosphatases alcalines (2). Cependant, dans les extraits de foie et de rein, les oxalates seraient sans action.

Parmi les effecteurs organiques, l'acide ascorbique ou vitamine C a un effet inconstant suivant les conditions d'action. Inhibiteur de l'enzyme A_1 de l'intestin selon EULER et SVENSON (3), il activerait, selon COURTOIS (4), la phosphatase A_3 très acide de la takadiastase. D'autre part, son pouvoir activateur vis-à-vis de la phosphatase A_1 du sérum, affirmé par TANNHAUSER, REICHEL et GRATAN (5), est nié par KING et DELORY (6). Son action est donc très irrégulière sur les enzymes isodyniques ; elle est même contestée par certains d'entre eux. La transformation de la vitamine C en acide déhydroascorbique, produit indifférent au point de vue effecteur, rend son étude plus difficile. Les thiols (cystéine, glutathion) sont fortement inhibiteurs de la phosphomonoestérase alcaline A_1 dans tous les organes. Cependant les produits d'oxydation (cystine, disulfures) le sont beaucoup moins, ou même pas, à des concentrations où les thiols ont une action très nette. Les pyrophosphatases sont

(1) BARRENSCHEN (H-K.) und LANG (S.). — *Biochem. Z.*, 1932, **252**, 395.

(2) BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 517.

(3) EULER SVENSON. — Cité d'après OPPENHEIMER. — Suppl., Lief 1 et 2, W. Junk, éd., La Haye, 1935, 98-170.

(4) COURTOIS (J.). — *Thèse Doctorat Sciences physiques*, Paris, 1938.

(5) TANNHAUSER (S-J.), RIEDEL (M.) and GRATAN (J-F.). — *J. biol. Chem.*, 1937, **121**, 697.

(6) KING (E-J.) and DELORY (G-E.). — *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1157.

moins sensibles à la présence des thiols et ceux-ci n'ont une action très nette que sur l'enzyme de l'intestin (1).

Les acides aminés ont une action discutée. Cependant ils seraient plutôt activateurs pour une concentration donnée au-delà de laquelle ils deviendraient inhibiteurs (2). En présence de Zn^{++} , leur action activatrice serait accrue.

L'action des acides biliaires est contestée : selon BODANSKY (3), ils inhiberaient la phosphatase alcaline de l'os et du rein et non celle de l'intestin.

On a signalé quelques glucosides (phlorhidzoside) (4) et alcaloïdes (quinine, morphine) comme inhibiteurs.

(1) Mlle LAURENS (A.). — *Thèse Doctorat Université (Pharmacie)*, Marseille, 1942.

(2) HOVE (E.), ELVEHJEM (C-A.) and HART (E-B.). — *J. biol. Chem.*, 1940, **134**, 425.

(3) BODANSKY (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, **118**, 341.

(4) LUNDSGARD. — Cité par COURTOIS et RABATTÉ, *Bull. Soc. Chim Biol.*, 1941, **23**, 184.

CHAPITRE II

MISE EN SOLUTION DES PHOSPHATASES DU THYMUS ET DOSAGE DE LEUR ACTIVITÉ.

Dans ce chapitre nous examinons successivement le thymus en tant qu'organe, son broyage, sa mise en macération, la préparation des poudres de phosphatases et l'étude de son activité phosphatasique.

A) L'organe.

Description du thymus (1). — C'est une glande à sécrétion interne, située dans la cage thoracique à la partie inférieure du cou, en avant de la trachée, à la partie supérieure du médiastin antérieur ; elle arrive

(1) Les éléments de la description de cet organe ont été pris dans le traité d'anatomie de ROUVIÈRE et « les Médicaments d'origine biologique » de A. ASTRUC et J. GIROUX.

au niveau du corps thyroïde. C'est un dérivé branchial comme les glandes parathyroïdes, le thymus provient de deux diverticules creux, issus eux-mêmes de la troisième fente branchiale. Primitivement formé de deux organes distincts qui se fusionnent ensuite et augmentent de volume jusqu'à l'âge adulte, le thymus s'atrophie rapidement, puis subit lentement une dégénérescence graisseuse. Il est constitué par deux lobes latéraux droit et gauche. Chaque lobe est formé par une série de lobules qui semblent implantés en spirale autour d'un cordon conjonctif. Dans ces lobules, on distingue des follicules dont la partie corticale présente, vis-à-vis des colorants vitaux, une plus grande affinité que la partie centrale. Histologiquement la différence réside dans une plus grande densité de la partie corticale ; on y observe un réseau de cellules épithéliales englobant des cellules analogues aux lymphocytes : les thymocytes.

Cet organe, très fortement irrigué, comprend en effet un réseau de capillaires sanguins et lymphatiques. Il est tributaire du tronc brachio-céphalique veineux gauche ; ses veines se jettent surtout dans les veines mammaires internes et thyroïdiennes inférieures. Ses artères proviennent des artères mammaires internes et thyroïdiennes inférieures. Les vaisseaux lymphatiques aboutissent aux ganglions des chaînes médiastinales antérieures et mammaires internes. Il reçoit des terminaisons d'origine sympathique.

Le thymus agit, en particulier, comme un organe lymphopoïétique et, à ce titre, il est le siège d'une activité phosphatasique considérable.

Au point de vue physiologique, le métabolisme de l'acide phosphorique a une très grande importance sur la croissance de l'individu et l'ostéogénèse, période

de la vie au cours de laquelle le thymus se développe beaucoup et joue un grand rôle sur ce métabolisme : en effet, la thymectomie apporte un retard dans la croissance et une diminution dans le développement du système osseux ; l'accroissement de celui-ci est en rapport direct avec celui du calcium qui est, à son tour, étroitement lié à celui de l'acide phosphorique. Très riche en nucléotides à acide thymonucléique, c'est dans le thymus que se forment les éléments des leucocytes que sont les nucléines et les nucléoprotéides ; l'acide phosphorique joue un rôle important dans la synthèse de ces derniers et les réactions, dans lesquelles il intervient, sont catalysées par des phosphatases. C'est pourquoi nous avons pensé faire des phosphatases du thymus l'objet de notre travail.

B) Préparation de la macération du thymus.

Dans ce paragraphe nous envisageons successivement le broyage du thymus, la préparation des poudres d'organes et la mise en macération des produits obtenus.

1^o) *Broyage.* — La constitution anatomique du thymus montre que cette glande est composée de très nombreux lobules qui rendent difficile la pulpation de cet organe ; celle-ci est facilitée en le triturant au mortier en présence d'une matière inerte, en particulier de sable. Celui-ci doit être siliceux : après un traitement préalable par l'acide chlorhydrique qui le débarrasse des carbonates et des bases qu'il pourrait éventuellement contenir, on s'assurera par ailleurs qu'il ne contient pas de dérivés phosphorés.

Le thymus peut être également broyé en se servant

de l'appareil broyeur de LATAPIE qui fournit une purée homogène très fine ; toutefois, pour des facilités de manipulations, nous avons utilisé la première méthode au cours de nos expériences.

La pulpe, traitée directement par l'eau distillée ou les solutions-tampons, libère les phosphatases, mais les produits obtenus sont doués d'une activité phosphatasique très variable : les lyoenzymes passent les premières en solution, les desmoenzymes, par contre, sont libérées peu à peu. Le temps de macération ainsi que la température influent sur le pouvoir enzymatique des solutions.

2^o) *Les poudres d'organes.* — Pour obtenir des produits plus stables donnant des résultats facilement comparables entre eux, nous avons préparé des poudres d'organes connues encore sous le nom de « poudres de phosphatases ». Elles sont obtenues à partir d'organes pulpés et desséchés selon certaines méthodes. Ces extraits ou poudres, repris par l'eau distillée suivant des conditions bien définies, donnent des produits d'une activité phosphatasique bien déterminée. La préparation de ces poudres est basée sur la précipitation des protéines par l'alcool ou l'acétone. Les protéines, se trouvant en quantité très élevée dans les organes animaux, sont dénaturées par cette méthode ; un traitement ultérieur par l'eau libère les diastases, une agitation mécanique détachant la fraction de diastases qui auraient pu être adsorbées par les protéines dénaturées.

La technique utilisée est la suivante, en présence d'acétone : on pulpe une certaine quantité de thymus, on le traite ensuite par dix fois son poids d'acétone pure anhydre ; on agite fréquemment et on laisse en contact pendant 24 heures. Au bout de ce temps,

on décante l'acétone et on essore la poudre obtenue. On la remet ensuite dans cinq fois son poids d'acétone pure ; après un contact durant 24 heures, on décante et on essore à nouveau. On procède à un troisième épuisement avec cinq fois son poids d'acétone ; après une dernière décantation, la poudre essorée est placée dans un exsiccateur où on fait le vide pour éliminer les dernières traces d'acétone. Après un séjour dans le vide durant plusieurs heures, la poudre obtenue est conservée dans un flacon bouché à l'émeri. Le rendement de poudre est, dans le cas du thymus, de 20 % environ. Cette méthode déshydrate complètement l'organe et le dégraisse également, assurant ainsi une conservation plus longue. On évite, de plus, les développements microbiens et ceux des moisissures.

Afin d'opérer dans des conditions comparables à celles de l'organe frais, il faudra donc, pour le reconstituer, ajouter quatre parties d'eau à une partie de poudre acétonique. Des études comparatives entre une pulpe fraîche et celle d'un même organe traitée par l'acétone, mises à macérer dans les mêmes conditions de température, de pH, de temps, etc..., ont donné des résultats légèrement plus faibles dans le cas du tissu traité par l'acétone. Parfois il arrive que l'on constate l'inverse dans d'autres organes : ces faits seraient dus à l'élimination par l'acétone ou l'alcool d'un effecteur organique naturel. Cependant cela n'a pas été noté dans le cas du thymus.

3°) *Macération.* — Les macérations sont obtenues, soit à partir de la pulpe fraîche, soit à partir de poudres acétoniques réhydratées, additionnées de quatre parties d'eau distillée ou de solutions-tampons ; toutefois la mise en solution des différentes phosphatases et leur stabilité sont variables. La poudre acétonique

permet d'obtenir des résultats plus comparables entre eux ; on doit cependant faire observer que le traitement acétonique fait varier l'état physique de la pulpe. Les variations de température ont une action sur l'activité des produits obtenus à partir de l'organe frais ou de la poudre acétonique ; ainsi cette activité est diminuée avec une trop forte élévation de température, alors qu'elle reste sans changement à la glacière ; en général elle atteint son maximum aux alentours de 37°. Ces considérations jouent un rôle primordial dans la conservation des macérations.

C) Etude de l'activité phosphatasique.

Dans ce dernier paragraphe, nous étudierons l'hydrolyse des substrats phosphoriques, l'emploi des effecteurs, la cinétique des réactions et la mesure de l'activité phosphatasique par le dosage de l'acide phosphorique libéré.

1°) *Hydrolyse des substrats phosphoriques.* — L'étude des différents systèmes phosphatasiques a été faite avec des solutions de substrats phosphoriques contenant la même quantité d'acide phosphorique libérable ; nous avons adopté le taux de 0 g. 700 de phosphore par litre ainsi que l'ont fait la plupart des auteurs qui ont étudié les phosphatases. Le macéré, retiré de la glacière, est additionné de l'ester phosphorique, puis porté à un pH donné et l'ensemble est mis à l'étuve à 37° pendant le temps désiré ; on arrête l'hydrolyse par addition d'acide trichloracétique et l'acide phosphorique libéré est dosé sur le filtrat trichloracétique.

Chaque tube à réaction est préparé selon la formule suivante :

Liquide de macération	1 cc.
Solution de substrat phosphorique ...	3 cc.
Acide ou base N/10	Q.S.P. pH voulu
Eau distillée	Q.S.P. 10 cc.

Au cours de l'hydrolyse enzymatique, la libération de l'acide phosphorique fait varier le pH de chaque tube dans des limites variables suivant la valeur de ce pH même. En milieu alcalin, elles sont plus grandes qu'en milieu acide. D'autre part, les acidités des acides glycérophosphorique et orthophosphorique ne sont pas les mêmes (1).

Ceci permet d'expliquer les variations de la valeur du pH. Toutefois, cette variation étant maxima vers les pH 8-9, zone de pH où, ainsi que nous l'avons vu au cours de la classification, se trouvent deux phosphatases importantes qui sont la phosphomono-estérase alcaline A_1 et la pyrophosphatase alcaline A_1 , nous avons pensé qu'il serait préférable de tamponner les milieux d'hydrolyse afin de rendre ces variations négligeables et nous avons modifié légèrement la formule donnée en premier lieu, par la suivante :

Liquide de macération	1 cc.
Solution de substrat phosphorique ...	3 cc.
Mélange tampon	2 cc.
Acide ou base N/10	Q.S.P. pH voulu
Eau distillée	Q.S.P. 10 cc.

Quelques gouttes de chloroforme sont ajoutées pour inhiber des fermentations étrangères et des développements microbiens. Le mélange-tampon utilisé est

(1) IMBERT, ASTRUC et BELUGOU. — *C. R.*, 1897, **125**, 1039.

constitué par le véronal sodique de MICHAELIS (1) : il est satisfaisant de pH 7 à pH 9,4. En région acide on utilise les mélanges de véronal 0,04 M et d'acide chlorhydrique 0,2 N.

La durée de séjour à l'étuve varie de quelques heures à quelques jours. Au début la quantité d'acide phosphorique libérée est proportionnelle au temps puis, peu à peu, la cinétique de la réaction s'abaisse et progressivement tend vers un palier qui est atteint plus ou moins rapidement suivant les substrats engagés, les enzymes étudiés, etc...

Les déterminations de pH ont été effectuées avec le potentiomètre de JOUAN à électrode de verre ; cette méthode laisse les mélanges intacts. La méthode colorimétrique, moins précise, a été peu utilisée.

La durée du séjour à l'étuve à 37° peut, ainsi que nous l'avons vu précédemment, varier de quelques heures, voire même de quelques minutes, à plusieurs jours. Aussi, est-il nécessaire, dans les temps courts, de les préciser en diminuant l'erreur due à l'hydrolyse s'effectuant en dehors de l'étuve, pendant la préparation du mélange, la mesure du pH et le temps que met le milieu à passer de la température ordinaire à 37° ; ce dernier peut être écourté par la technique suivante : on porte les tubes, après la mesure du pH, dans un bain-marie ayant une température légèrement supérieure à 37° (40° environ) et on les agite, afin de les amener rapidement à 37°, puis on les porte à l'étuve. Au bout du temps voulu d'hydrolyse, on les refroidit énergiquement. Cependant cet arrêt n'est pas définitif : c'est pourquoi on fait des prises de 1 cc. auxquelles on ajoute 2 cc. d'acide trichloracétique à

(1) MICHAELIS (I.). — *J. biol. Chem.*, 1930, **87**, 33.

20 % qui précipite les protéines et dénature les enzymes. On complète à 10 cc. les 3 cc. ainsi formés par la prise du milieu d'hydrolyse et d'acide trichloracétique. On filtre et on procède alors aux dosages. On peut utiliser plusieurs méthodes de microdosages qui ont été employées suivant les auteurs.

2^o) *Emploi des effecteurs.* — Les effecteurs ont été utilisés sous forme de solutions aqueuses, dans la plupart des cas, de sels. Le plus souvent nous avons utilisé les sulfates (magnésium, manganèse, zinc, cuivre) sauf pour le calcium où nous avons employé l'acétate. Comme concentration, nous avons fait des solutions décimolaires dont 1 cc. dans chaque tube à réaction était porté ultérieurement à 10 cc. ; aussi la concentration finale était centimolaire. Dans le cas du calcium, nous avons opéré avec une solution-mère centimolaire afin d'éviter la précipitation de cet effecteur au cours des opérations, la concentration finale étant millimolaire. Dans le cas du cholestérol qui est très peu soluble, nous avons utilisé une solution alcoolique à 1 %. Au cours de la préparation des tubes à réaction, ce dernier donnait une émulsion stable ; nous avons vérifié la stabilité en faisant une dilution avec de l'eau distillée et une avec de l'eau ordinaire. Dans les deux cas, la solution opalescente a tenu au moins 48 heures.

Pour la vitamine C, nous avons été amené à utiliser des échelles de concentrations qui ne permettaient pas de diluer les solutions faites. Dans ces cas, nous avons dissout l'acide ascorbique cristallisé dans le milieu de réaction lui-même.

3^o) *Cinétique de la réaction.* — La réaction d'hydrolyse des esters phosphoriques est une réaction lente et limitée ; elle est également réversible. La désinté-

gration des esters phosphoriques en acide orthophosphorique et alcool ou phénol est catalysée par les phosphatases. Sans supprimer la limite de la réaction, elles ne font que diminuer le temps mis pour l'atteindre. Suivant l'origine des organes, l'hydrolyse peut être plus ou moins rapide ; ceci peut tenir à un certain nombre de facteurs tels que la concentration de l'organe en diastase, les effecteurs naturels de la phosphatase. Aussi, cherche-t-on à apprécier la vitesse de la réaction. Pour comparer entre elles les intensités des divers phénomènes diastasiques, on dose l'acide phosphorique existant dans le mélange d'hydrolyse immédiatement après la formation de ce dernier, puis après 5, 10, 20, 30 minutes à l'étuve ; les temps sont ensuite beaucoup plus espacés : 1, 3, 6, 12, 24, 48 heures. Les premières mesures sont délicates et, ainsi que nous l'avons vu précédemment, on aura recours à l'usage d'un thermostat à 37° et même légèrement supérieur au point de vue température.

La réaction inverse, c'est-à-dire la synthèse, a également lieu. Les premiers auteurs, qui s'occupèrent de cette question, furent MARTLAND et ROBISON (1) qui mirent en évidence la diminution de la teneur en phosphore minéral avec un léger excès de mannitol, glycol et de glycérol. Cette diminution fut notée également avec les phosphatases de rein et de duodénum par KAY (2), de la glande mammaire par FOLLEY et KAY (3), du sang par ROCHE (4). VON EULER et ses élèves (SCHAFFNER) (5) ont donné de nombreux

(1) MARTLAND (M.) et ROBISON (R.). — *Biochem. J.*, 1927, **21**, 665.

(2) KAY (H-D.). — *Biochem. J.*, 1928, **22**, 855.

(3) FOLLEY (S-J.) et KAY (H-D.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1837.

(4) ROCHE (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, **13**, 841.

(5) SCHAFFNER (A.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1937, **248**, 159.

arguments en faveur de l'existence d'une diastase uniquement synthétisante, catalysant la phosphorylation des glucides. Cet enzyme ou **phosphatèse** a pu être débarrassée de la phosphatase hydrolysante.

4^o) *Microdosages de l'activité phosphatasique.* — La plupart des auteurs mesurent l'activité phosphatasique par un microdosage du phosphore libéré. Certains contrôlent le premier par un microdosage de l'alcool ou du phénol; mais ces derniers sont assez longs et nous ne les avons pas effectués personnellement; aussi nous ne signalerons que leur principe.

La méthode de microdosage du glycérol est celle de FLEURY et FATOME (1), elle est basée sur l'action du périodate de sodium sur le glycérol.

Le microdosage du phosphore a été pratiqué plus fréquemment selon deux méthodes : celle de COPAUX (2) et celle de BRIGGS ; nous avons utilisé la seconde.

a) MÉTHODE DE COPAUX. — Ce microdosage est basé sur la formation, entre l'acide phosphomolybdique l'éther et l'eau, d'un complexe de composition sensiblement fixe et formant un produit huileux de densité assez grande pour être séparé par centrifugation ou décantation. Le volume de ce complexe est mesuré dans une ampoule à décantation qui a été préalablement étalonnée.

b) MÉTHODE DE BRIGGS. (3) — Ce microdosage est basé sur la réduction, en milieu acide, par le sulfite de sodium et l'hydroquinone, de l'acide phosphomolybdique qui va donner une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la teneur en complexe phosphomolybdique donc en acide phosphorique libéré.

(1) FLEURY (P.) et FATOME (M.). — *J. Pharm. Chim.*, 1935, **21**, 247.

(2) COPAUX (H.). — *C. R.*, 1921, **173**, 656.

(3) BRIGGS. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1935, **17**, 1707.

La technique est la suivante : on mesure exactement 2 cc. de filtrat trichloracétique dans un tube jaugé de 10 cc. On ajoute successivement 2 cc. de solution sulfurique de molybdate d'ammonium, 1 cc. de solution de sulfite de sodium à 20 % et 1 cc. de solution d'hydroquinone à 0 g. 5 %. On complète alors au trait de jauge avec de l'eau distillée. On mélange, on laisse 30 minutes au repos. Au bout de ce temps, on compare au colorimètre avec une solution-type contenant 0 g. 0125 de phosphore par litre et soumise à la même méthode de microdosage.

Les diverses solutions sont préparées ainsi :

La solution sulfurique de molybdate d'ammonium est préparée en dissolvant 25 g. de molybdate d'ammonium dans 300 cc. d'eau distillée. On filtre puis on ajoute un mélange refroidi de 75 cc. d'acide sulfurique pur avec 125 cc. d'eau distillée.

La solution-étalon de phosphore s'obtient en diluant 25 cc. d'une solution-mère de 0 g. 4394 de phosphate monopotassique (dont 1 cc. correspond à 0,1 mg. de phosphore) à 200 cc. avec de l'eau distillée : 2 cc. correspondent à 0 mg. 025 de phosphore.

Quand à la solution à 0 g. 5 % d'hydroquinone, on assure sa conservation par l'addition d'une goutte d'acide sulfurique pur.

Cette méthode de microdosage permet d'atteindre une précision qui est de l'ordre de 1 %. Mais, dans certains cas, elle exige de légères modifications car ce microdosage du phosphore se fait en milieu très acide. L'étude de la vitamine C et du couple vitamine C et cuivre comporte l'inconvénient d'utiliser un produit réducteur qui peut réduire le réactif sulfomolybdique surtout lorsque la vitamine C est employée à forte concentration. Aussi, pour pallier à cet inconvénient,

on laissera la coloration se développer pendant 20 minutes seulement et non une demi-heure comme précédemment, ainsi que Mlle DURAND l'a indiqué pour les pyrophosphates. Ceux-ci, en effet, en milieu très acide, peuvent s'hydrolyser spontanément en acide orthophosphorique et donner un résultat erroné par excès. Il en est de même pour les métaphosphates.

CHAPITRE III

LE SYSTÈME PHOSPHOMONOESTÉRASIQUE DU THYMUS.

L'étude de ce système phosphatasique a été effectuée avec le β -glycérophosphate de sodium comme substrat phosphorique. Afin de réaliser la solution à 0 g. 700 de phosphore par litre, nous avons dissous 6 g. 91 de β -glycérophosphate de sodium pur dans un litre d'eau distillée ; cette solution est stable et ne subit pas d'hydrolyse partielle avec le temps. Les techniques habituelles, décrites dans le deuxième chapitre, ont été appliquées normalement. La solution enzymatique a été composée soit à partir de produit frais, soit à partir de poudres acétoniques.

Nous avons envisagé successivement l'influence de la durée de séjour à l'étuve, de la durée de macération, du pH de celle-ci, des épuisements successifs et de la purification des macérés.

1^o) *Variation de la durée du séjour à l'étuve à 37° :*

L'action d'une macération aqueuse de produit frais, durant quarante-huit heures, à la température de

13°-15°, sur le β -glycérophosphate de sodium permet d'obtenir les résultats suivants :

a) Après un jour d'hydrolyse à l'étuve à 37° :

pH	1,8	2,5	3,3	3,8	4,5	5,1	5,7	6,6	7,7	8,5	9,1	10
P %	0	1	2	2	10	9	16	12	14	32	41	15

b) Après deux jours d'hydrolyse à l'étuve à 37° :

pH	1,8	2,5	3,3	3,8	4,5	5,1	5,7	6,6	7,7	8,5	9,1	10
P %	0	2	2	4	13	14	20	16	25	40	60	18

c) Après trois jours d'hydrolyse à l'étuve à 37° :

pH	1,9	2,6	3,3	3,9	4,7	5,2	5,8	6,7	7,9	8,6	9	10
P %	0	2	3	6	15	18	21	17	27	42	62	20

Ces trois tableaux montrent que le système phosphomonoestérasique du thymus comprend deux enzymes, l'un, en région alcaline : la phosphomonoestérase de pH optimum 9,1, l'autre, en région acide, la phosphomonoestérase de pH optimum 5,7.

La quantité d'acide phosphorique libéré pendant la 3^e journée d'hydrolyse est faible et peut être considérée comme sensiblement nulle ; en effet, elle est de l'ordre de l'erreur susceptible d'être faite au cours des opérations. C'est pourquoi nous considérerons le maximum d'action atteint après un séjour de quarante-huit heures d'étuve à 37°.

2°). *Durée de la macération :*

La durée de la macération a été étudiée et les expériences ont été effectuées sur des macérations courtes de 6 heures, puis de 24 heures et enfin de huit jours. Les expériences ont donné les résultats suivants, après un séjour identique de 24 heures à l'étuve à 37° :

a) Macération de 6 heures :

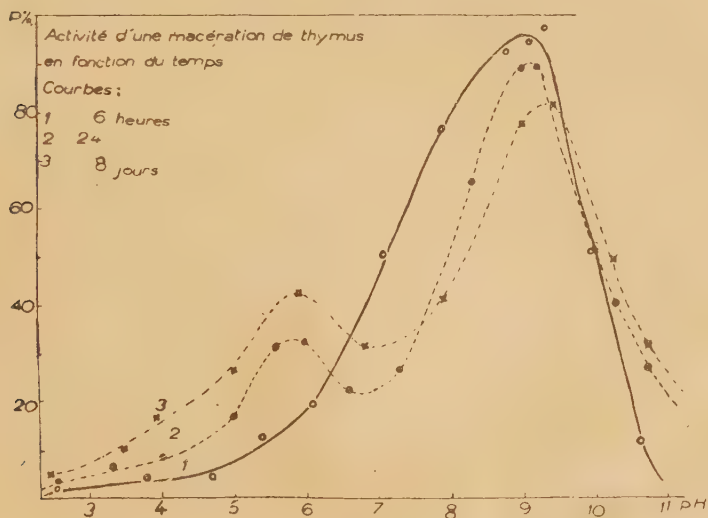
pH	2,6	3,8	4,7	5,4	6,1	7,1	7,9	8,8	9,1	9,3	10,0	10,6
P %	2	4	4	12	19	50	76	92	94	97	51	11

b) Macération de 24 heures :

pH	2,3	3,3	4	5	5,6	6	6,6	7,3	8,3	9	9,2	10,3	10,6
P %	3	6	8	16	31	32	22	26	65	89	89	40	26

c) Macération de 8 jours :

pH	2,3	3,5	3,9	5	5,9	6,9	7,9	9	9,4	10,3	10,7
P %	5	10	16	26	42	31	41	77	81	49	31



L'étude des tableaux précédents et des courbes montre qu'au début les phosphatases alcalines sont libérées rapidement ; au bout d'une période relative- ment courte, les enzymes alcalins (ici nous avons affaire à la phosphomonoestérase alcaline A_1 car le substrat utilisé est le β -glycérophosphate de sodium) se dégradent tandis qu'en milieu acide l'activité se développe et se maintient temporairement.

Certaines macérations de thymus nous ont révélé

une action phosphatasique au pH 4,5 ; celle-ci disparaît d'ailleurs sous l'action du magnésium 0,01 M. Le tableau suivant, entre autres, nous prouve son existence ; le temps de macération est de dix jours et le temps d'autolyse, à 37°, de deux jours :

pH	2,5	3,4	3,7	4,2	4,9	5,4	6,1	6,5	7	8,3	9,1	9,4
P %	4	6,3	14	24,5	19	27	51	42	43	75	97	56

Toutefois son action, faible et irrégulière suivant les organes étudiés, ne nous a pas permis de la classer dans le système phosphomonoestérasique du thymus ; nous ne ferons que le signaler en passant.

3°) *Variations du pH de la macération :*

Le pH joue également un rôle assez important dans la libération des enzymes. Aussi a-t-on essayé de faire des macérations avec des solutions tampons ou même d'acide acétique ou d'ammoniaque N/40. Les résultats trouvés ont montré que les enzymes, dont le pH optimum est situé en région alcaline, sont plus vite libérés par une solution alcaline que par l'eau distillée ; la macération a été faite avec de l'organe frais :

Macération avec l'eau distillée : 3 jours.

Hydrolyse à 37° : 14 heures.

pH	1,8	3,7	5,5	6,5	7,2	7,9	8,6	9,1	10
P %	0	3,1	10,2	7,5	7,9	13,1	15	22	5

Macération avec l'ammoniaque : 3 jours.

Hydrolyse à 37° : 14 heures.

pH	2,2	4,1	5,7	6,6	7,5	7,9	8,5	9,1	11
P %	0	1	4	4	9	11,5	23	29	7

Le pH naturel de nos macérations, faites avec l'eau distillée, s'est révélé constant et égal à 6,3.

4^o) *Epuisements successifs de la macération :*

Nous avons étudié ensuite l'épuisement de l'organe par l'eau distillée. Jusqu'ici nos recherches ont porté sur le même liquide de macération. Dans cette étude, nous avons renouvelé l'eau distillée toutes les 24 heures, après avoir centrifugé l'organe pulpé, et séparé les liquides de macération.

Le premier liquide obtenu a été désigné par la lettre L_1 afin de montrer que c'était la première partie liquide ayant servi à extraire les principes de la pulpe d'organe ; celle-ci, après centrifugation, a donc été extraite à nouveau par de l'eau distillée et, après 24 heures de macération, nous avons obtenu le liquide de macération L_2 , séparé par centrifugation de la pulpe. Cette dernière, reprise par de l'eau distillée pendant 24 heures, donne le dernier liquide de macération L_3 , séparé par centrifugation du résidu qui, par un traitement semblable aux précédents, s'est révélé sans activité notable.

Le premier liquide L_1 , après une hydrolyse de 24 heures à 37°, donne les résultats suivants :

pH	3	4	4,6	5,5	6	6,8	7,3	8,1	8,6	9,1	9,6	10,5
P %	0	12	20	24	20	18	16	39	58	80	63	29

Le liquide L_1 , soumis à une dialyse de trois jours, donne un liquide purifié des électrolytes que contenait L_1 , notamment le taux des phosphates a diminué de 0 g. 545 par litre de macération à 0 g. 108. Les phosphates restant doivent vraisemblablement leur origine à la destruction des tissus ; ce liquide dialysé est actif sur le β -glycérophosphate de sodium et, dans les

mêmes conditions d'expériences, a donné les résultats ci-après :

pH	3	4,5	5,2	5,7	6,3	6,7	7,3	8,2	8,5	9,0	9,7	10,3
P %	1	11	19	23	20	18	14	40	58	78	58	19

La dialyse n'a donc pas influé sur l'activité phosphatasique. Les différences sont de l'ordre de l'erreur.

Le liquide L₂, dans les mêmes conditions d'expérience, donne les résultats suivants :

a) Sans dialyse :

pH	2,5	3	3,6	4,1	4,9	5,6	6,2	6,8	7,5	8,1	9,1	10,3
P %	0	0	3	4	6	8	6	2	11	22	50	12

Le liquide L₂ contient très peu d'enzyme A₂ libre et une proportion légèrement réduite d'enzyme A₁ :

b) Après dialyse :

pH	2,3	3,1	3,5	4,2	4,9	5,7	6,3	6,9	7,5	8,2	9,1	10,6
P %	0	0	0	3	5	7	4	2	8	18	47	2

Ces résultats sont comparables aux précédents. Le liquide de macération ne contient donc pas de substances inhibitrices dialysables. Le troisième liquide L₃, mis au contact du substrat phosphorique, donne, après 24 heures d'hydrolyse à 37°, les résultats suivants :

a) Avant dialyse :

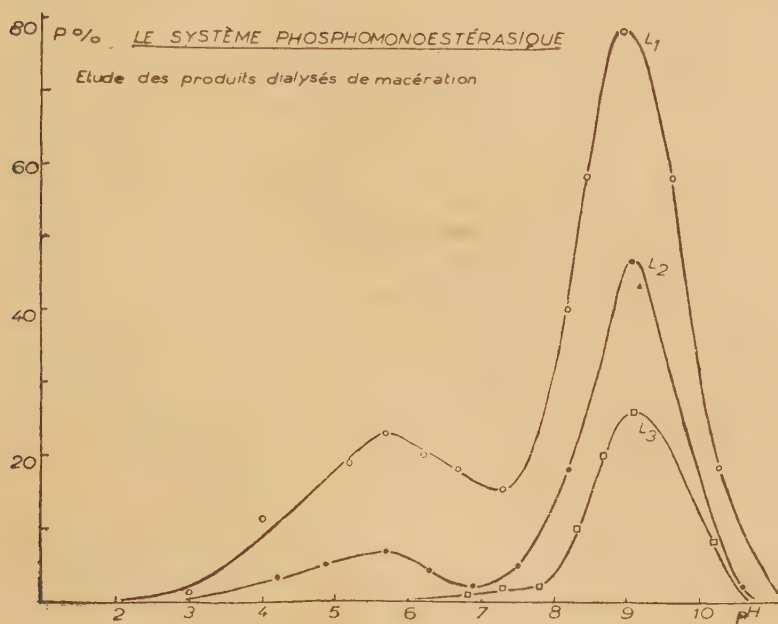
pH	2,5	3,2	4,1	4,9	5,7	6,3	7	7,8	8,2	8,7	9	10,7
P %	0	0	0	0	3	2	3	5	12	20	27	2

b) Après dialyse :

pH	2,3	3	3,8	4,7	5,6	6,8	7,3	7,6	8,3	8,7	9,1	10,2
P %	0	0	0	0	0	1	2	2	10	20	26	8

Les résultats sont les mêmes dans les deux cas : l'activité, en milieu acide, a presque totalement disparu tandis qu'en milieu alcalin subsiste une légère action

phosphatasique ainsi que le montrent les courbes suivantes :



En résumé, nous pouvons conclure de cette étude sur l'épuisement de la pulpe que le temps de macération optimum est 48 heures : en effet, au cours des premières vingt-quatre heures, la majeure partie des enzymes est libérée mais, au cours de la deuxième journée, une quantité non négligeable passe en solution. A partir de la troisième journée, l'activité enzymatique libérée est négligeable. D'autre part, nous noterons l'action phosphatasique persistante en milieu alcalin alors qu'elle décroît rapidement et même disparaît en milieu acide.

5°) *Purification des phosphatases :*

Les phosphatases voient leur activité influencée par

un nombre considérable de facteurs, aussi utilise-t-on, pour leur purification, des procédés physiques tels que la dialyse, ainsi que nous l'avons vu au cours de l'étude précédente, et l'adsorption suivie d'élution.

a) DIALYSE. — La dialyse permet la purification du liquide de macération en éliminant les substances non colloïdales telles que les électrolytes et un certain nombre de composés chimiques de structure relativement simple. Les phosphatases ne sont pas dialysables ; dans certains cas, cependant, pour certaines valeurs du pH, la phosphatase peut se dissocier en apophosphatase et cophosphatase, cette dernière seule étant dialysable. Mais, si on se place dans les conditions de stabilité de la phosphatase, la dialyse est un bon procédé de purification.

Le contrôle électrométrique, par mesure de conductivité du dialysat, nous a prouvé que l'opération était terminée pratiquement au bout de 48 heures ainsi que le montre le tableau suivant : le temps est exprimé en heures et la variation de conductivité $\Delta\lambda$, en mhos/cm. :

temps	6	12	18	24	30	36	42	48
$\frac{\Delta\lambda}{\Delta t} 10^6$	47,4	26,6	16,5	11,2	7	5	4	3,7

L'opération de la dialyse exige quelques précautions : les protéines, par suite d'osmose, provoquent un appel d'eau qui dilue le milieu et abaisse l'activité phosphatasique ; pour parer à cet inconvénient, nous avons maintenu le liquide de macération en surpression vis-à-vis de l'eau distillée afin de compenser la pression osmotique.

b) ADSORPTION ET ÉLUTION. — Le principe de cette méthode est le suivant : l'enzyme, suivant le pH de

sa solution, se fixe plus ou moins facilement sur les adsorbants que l'on met en suspension ; aussi, après avoir choisi un pH pour lequel un enzyme se fixe sur un adsorbant donné, on sépare celui-ci du milieu et on le met en contact avec des solutions de pH favorisant la libération de l'enzyme entraîné. Le pH employé est appelé pH d'élution.

La technique employée est la suivante : dans une série de douze tubes à essais, nous avons mis 5 cc. de macération et 0 g. 25 d'alumine pour chromatographie. Chaque tube a été porté à un pH déterminé, puis l'ensemble a été soumis à une agitation mécanique de trente minutes. Le contenu de chaque tube a été centrifugé et les liquides surnageants décantés ; nous avons pris les pH de ces derniers et nous avons obtenu des résultats différents des précédents, montrant que l'alumine joue un rôle tampon assez net :

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH avant	3,8	4,3	5,15	5,4	5,5	6,3	7,5	8,05	8,75	8,95	9	9,8
pH après	4,7	5,2	6	6,3	7,1	7,6	8,2	8,3	8,5	8,75	8,9	9,45

Les culots de centrifugation ont été repris par un volume d'eau distillée égal à celui des liquides surnageants décantés ; portés à un pH identique ils ont été agités pendant trente minutes puis centrifugés : le pH choisi avait été fixé arbitrairement à 7. Les dosages des phosphatases, dans les liquides d'adsorption et d'élution, nous ont montré quel était le pH optimum d'adsorption ; les résultats trouvés, à partir des culots de centrifugation élués correspondant à chacun des tubes du tableau précédent, sont les suivants :

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P %	27	39	43	37	33	21	18	16	16	15	14	14

L'activité enzymatique la plus importante est donc obtenue à partir du tube 3 ; en se reportant au tableau des pH, on constate donc que le pH optimum d'adsorption est compris entre 5,15 et 6 ; il est donc de 5,5.

Ces résultats sont confirmés par ceux que donnent les liquides décantés en premier lieu :

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P %	20	10	6	7	13	20	23	25	27	30	29	32

Un tube, n'ayant pas subi d'adsorption, indiquait, dans des conditions semblables, une activité phosphatase de 70 %. Nous avons recherché enfin le pH optimum d'élution. Pour cela, nous avons fabriqué une quantité importante d'adsorbat à pH 5,5 et nous l'avons éluee avec la quantité d'eau correspondante, dans une série de tubes qui ont été ensuite portés à des pH différents et agités mécaniquement pendant quinze minutes ; nous avons eu les résultats suivants :

pH (élution)	6,3	7,1	8,2	9,1	9,8	10,7
P %	25	27	32	35	31	22

Le pH optimum d'élution est donc 9,1. L'activité des phosphatases est inférieure à celle de la dialyse, mais ce procédé permet de séparer les protéines.

A. — Etude de la phosphomonoestérase A₁.

1°) **L'enzyme.** — La phosphomonoestérase alcaline A₁ se rencontre dans de très nombreux organes animaux et végétaux. Son pH optimum d'action est variable selon l'origine. Parmi les organes animaux, nous pouvons citer :

la phosphomonoestérase A ₁ de l'os	pH optimum.....	8,2 (1)
«	« de rein de porc	pH optimum 8,5 (2)
«	« de rein de cobaye	pH optimum 10,0 (3)
«	« de cerveau	pH optimum 9,2 (4)
«	« de l'intestin	pH optimum 9,2 (5)
«	« du foie	pH optimum 9,2 (6)
«	« de plasma de cheval	pH optimum . 8,8 (6)
«	« de glande mammaire	pH optimum . 8,9 (3)
«	« de corticosurrénale	pH optimum ... 9 (7)
«	« de médullosurrénale	pH optimum .. 9 (7)

Pour le thymus, cette valeur n'a jamais été donnée : aussi avons-nous précisé cette position du pH optimum en faisant des mesures d'hydrolyse sur des tubes de pH très rapprochés et, après un temps d'étuve à 37° de trois heures, nous avons repris le pH de chaque tube qui avait été tamponné au début de l'expérience. La durée de macération étant de deux jours, les résultats obtenus sont les suivants :

pH initial	8,35	8,55	8,9	9,05	9,1	9,3	9,5
pH final	8,35	8,55	8,9	9	9,1	9,15	9,35
P %	12	17,1	33,3	34,7	36,0	35,7	34,7

Nous avons précisé ainsi la valeur du pH optimum qui est de 9,1 pour la phosphomonoestérase A₁ du thymus (organe frais). Cependant nous avons, au cours de nos travaux, été amené à des valeurs légèrement différentes selon les conditions expérimentales ; aussi peut-on admettre des limites plus larges et donner comme valeur du pH optimum : 8,9 - 9,2.

(1) MARTLAND (M.) et ROBISON (R.). — *Biochem. J.*, 1927, **21**, 665.

(2) JACOBSEN (E.). — *Biochem. Z.*, 1932, **249**, 21.

(3) FOLLEY (S.-J.) et KAY (H.-D.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1837.

(4) GIRI (K.-V.) et DATTA (N.-C.). — *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1089.

(5) ROCHE (J.), Mlle de LAROMIGUIÈRE (S.) et Mlle LAURENS (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 1019.

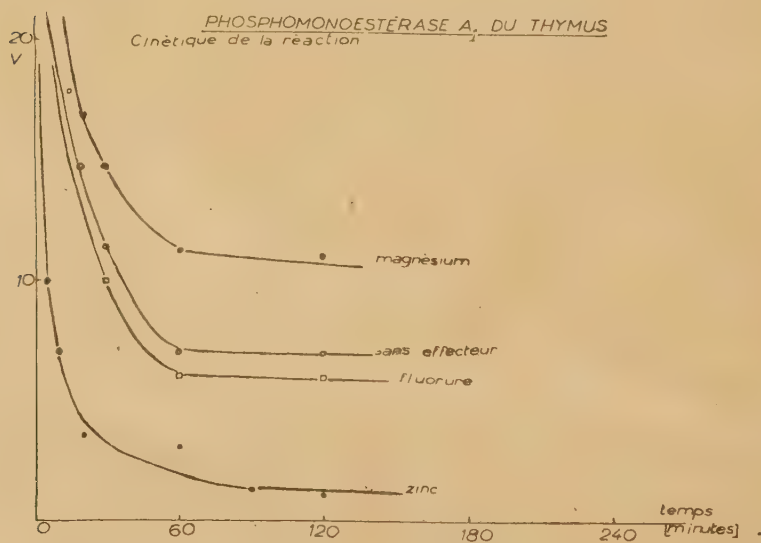
(6) ROCHE (J.) et Mlle LATREILLE (M.). — *Enzymologia*, 1937, **3**, 75.

(7) BESSOLES (H.). — *Thèse Doctorat Pharm. Université, Montpellier*, 1944.

2^o) **Cinétique de la réaction catalysée par la phosphomonoestérase A₁ du thymus.** — Cet enzyme est la plus active des phosphatases du thymus. Nous avons défini une vitesse de réaction en faisant le rapport du phosphore libéré au temps nécessaire à cette réaction. Nous avons constaté que ce rapport tend vers une limite qui est atteinte au bout d'une heure :

Temps (minutes)	5	10	20	30	60	120
P mg. libérés par litre	189	231	294	336	420	840
$V = \frac{\text{Phosphore}}{\text{temps}}$	38	23	14,7	11,3	7	7

Les résultats précédents sont indiqués dans la courbe « sans effecteur » ci-après :



L'étude de la phosphomonoestérase A₁ du thymus, à partir des poudres acétoniques, conduit à des résultats comparables à ceux du tissu frais.

3^o) **Les effecteurs de la phosphomonoestérase A₁ du thymus.** — Parmi les effecteurs nous avons étudié :

- a) Les cations : magnésium, manganèse, calcium, fer, cuivre, zinc.
- b) Les anions : fluorures, cyanures et oxalates.
- c) Les corps organiques : cholestérol, acide ascorbique, acide cholique, alanine et cystine.
- d) Les couples : alanine-Zn⁺⁺, vitamine C-Cu⁺⁺, cystéine-Fe⁺⁺.

a) **LES CATIONS.**

Le magnésium. — Le magnésium s'est révélé un activateur puissant dans l'étude des phosphomonoestérases alcalines. Cette action a été découverte par ERDTMANN (1), en 1927, en étudiant la phosphomonoestérase rénale en présence de ce métal. Cette activité a été étendue à l'ensemble des organes contenant la phosphomonoestérase A₁, et FOLLEY et KAY en font un caractère de diagnostic de cet enzyme.

Cet élément a été utilisé sous forme de sulfate de magnésium en solution aqueuse centimolaire. En milieu alcalin, il y a une légère précipitation de magnésie. Cet élément étant assez proche de l'aluminium et le kaolin, qui est un adsorbant, contenant un peu de magnésie, nous avons vérifié l'absence d'adsorption par la magnésie.

Le liquide de macération du thymus, étudié dans les mêmes conditions en présence et en l'absence de magnésium, a donné les résultats suivants :

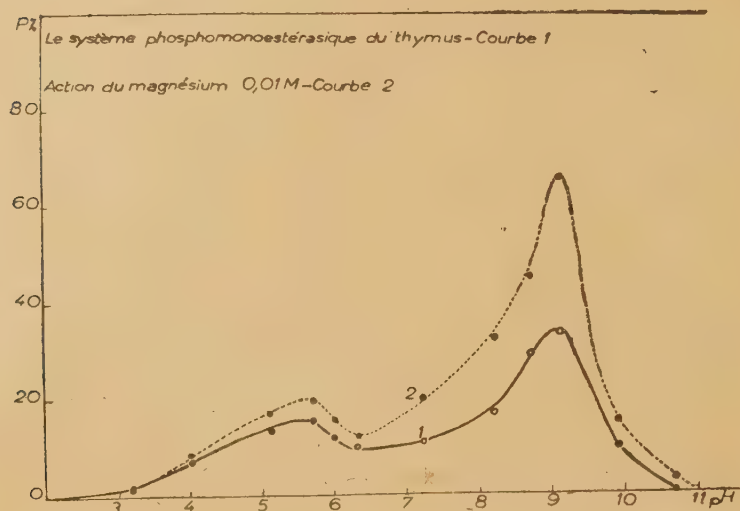
48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37°.

pH	7,3	8	8,6	9,1	9,7	10,7
P % (sans Mg)	12	15	26	34	10	2
P % (avec Mg)	20	30	40	63	17	2

(1) ERDTMANN. — *Z. Physiol. Chem.*, 1927, **172**, 182.

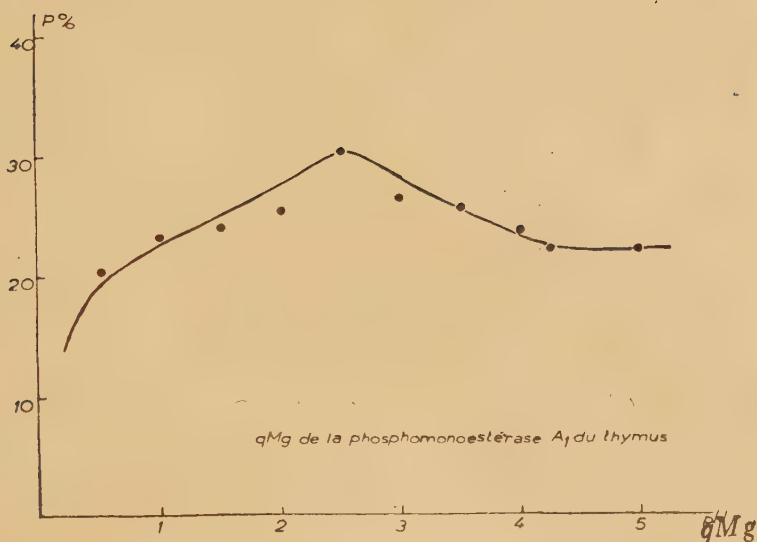
L'expression graphique du tableau précédent nous est donnée par les courbes suivantes :



Le magnésium agit donc comme activateur de la phosphomonoestérase A_1 du thymus ; cette action, très nette, varie en fonction de la concentration : nous avons défini précédemment une notion de q Mg, nous avons déterminé sa valeur dans le cas de la phosphomonoestérase A_1 . Pour cela, le taux de phosphore libéré en une heure a été dosé au pH optimum de l'enzyme A_1 et à des q Mg différents :

q Mg	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,3	∞
P %	18,2	23,4	24,1	25,5	30,4	26,6	26	23,9	22,3	22,3

L'examen de ces résultats montre que le magnésium est très activateur pour la valeur 2,5 du q Mg : c'est le q Mg optimum de l'enzyme ; pour des valeurs faibles, c'est-à-dire pour de fortes concentrations, le magnésium devient inhibiteur de l'enzyme A_1 (voir courbe ci-après).



La cinétique de la réaction est légèrement modifiée par la présence du magnésium centimolaire, la vitesse avait, dans le cas de la réaction sans effecteur, donné un palier-limite égal à 7 au bout d'une heure. En présence de magnésium, la limite de la vitesse est plus grande ainsi que le montrent les résultats suivants, quoique le temps mis pour l'atteindre soit identique (voir courbe page 62) :

Temps (minutes)	5	10	20	30	60	120
P libéré (mg. ‰)	210	252	336	441	672	1.310
Vitesse	42,2	25,2	16,8	14,7	11,2	11

Il nous a paru intéressant de vérifier si la dialyse ne faisait pas varier la valeur du q Mg du produit de macération brut : cette valeur n'est pas modifiée. On doit faire remarquer que la quantité de magnésium contenue dans le thymus est extrêmement faible :

un microdosage, effectué par la méthode de VELLUZ (1), montre que 100 g. d'organe frais contiennent 2 mg. 5 de magnésium, quantité qui peut être considérée comme négligeable. D'autre part, nous avons étudié l'activation de la phosphomonoestérase A_1 , dans le produit de macération dialysé, par le magnésium, nous avons obtenu les résultats suivants :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37°.

pH	6,3	7,2	8,2	8,7	9,1	9,9	10,7
P % (sans Mg)	10	11	17	29	33	10	0
P % (avec Mg)	12	20	32	45	65	15	3

L'activation est restée sans changement notable (cf. page 63).

Le manganèse. — L'ion manganèse est considéré, selon HORII (2), comme activateur ou inhibiteur selon le substrat, alors que, pour TANNHAUSER, REICHEL et GRATTAN (3), il serait toujours activateur pour la phosphomonoestérase alcaline du sérum. BAMANN (4) considère que son action est plus puissante que celle du magnésium ; avec des produits de macération de foie, de rein, de rate et de levure, alors que le magnésium donne une activité maximum de 8.800 pour 100, le manganèse permettrait d'atteindre 25.000 pour 100.

Le manganèse a été utilisé à l'état de sulfate de manganèse en solution 0,01 M. La comparaison, entre des mélanges enzyme-substrat et enzyme-substrat-man-

(1) VELLUZ. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, **16**, 1531.

(2) HORII. — Cité d'après OPPENHEIMER (C.). — *Die Fermente und ihre Wirkungen*. Supplement., Lief 1 et 2, W. Junk, éd., La Haye, 1935, 98-170.

(3) TANNHAUSER (S.-J.), GRATTAN (S.-F.) and REICHEL (M.). — *J. biol. Chem.*, 1937, **121**, 709.

(4) BAMANN (E.). — *Naturw.*, 1940, **28**, 142 et *ibid.*, 3405.

ganèse, a donné le tableau suivant, après 3 heures d'hydrolyse à 37° (la solution enzymatique était obtenue par la dialyse du produit de macération de deux jours).

pH	6,7	8,1	8,8	9,1	9,4	10,2	10,8
P % (sans Mn)	9	13	30	37	23	10	0
P % (avec Mn)	14	22	45	56	40	13	2

Ces résultats montrent que le manganèse est activateur de la phosphomonoestérase A₁ du thymus.

Nous avons comparé l'activité de cet effecteur avec celle du magnésium à la même concentration. Les résultats suivants ont été obtenus au même pH (9,1) :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37°.

Effecteur	Néant	Manganèse 0,01 M	Magnésium 0,01 M
P %	35	57	62

Le manganèse est donc un activateur de la phosphomonoestérase A₁ plus faible que le magnésium.

Le calcium. — L'ion calcium a une action très controversée. Pour KEESER (1), il serait antagoniste de l'ion magnésium en raison de leur action inverse sur la stabilité des protéines colloïdales. Pour KUWABARA (2), il serait activateur de la phosphomonoestérase A₁ dans les cals de fracture.

Nous avons utilisé le calcium, dans le cas du thymus, à l'état d'acétate de calcium en solution millimolaire par suite de la précipitation facile de cet ion dans

(1) KEESER. — Cité d'après OPPENHEIMER (C.). — *Die Fermente und ihre Wirkungen*. Supplement., Lief. 1 et 2, W. Junk, éd., La Haye, 1935, 98-170.

(2) KUWABARA (G.). — *J. Biochem. Japan*, 1932, 16, 403.

les milieux. L'essai a été fait dans des conditions analogues aux précédentes :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	6,3	9,1	10
P % (sans Ca)	10	36	6
P % (avec Ca)	9	44	7

Ces résultats permettent d'accorder au calcium un rôle légèrement activateur vis-à-vis de la phosphomonoestérase A_1 du thymus. A la suite de travaux faits sur certains organes (1), on a noté que l'action combinée des ions Mg^{++} , Mn^{++} et Ca^{++} est activatrice sur la phosphomonoestérase A_1 ; nous avons pensé qu'il serait intéressant de vérifier leur action simultanée sur le thymus. Nous avons fait agir à une même concentration pour le magnésium, le manganèse et le calcium (0,001 M) et au même pH (9,1), chacun de ces ions séparément puis ensemble :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

Effecteurs	Néant	Magnésium	Manganèse	Calcium	Magnésium Manganèse Calcium
P %	36	64	56	42	64

L'action des effecteurs n'est donc vraisemblablement pas une action synergique : le magnésium, ion plus puissant, exerce son action à l'exclusion des autres. Ceci semble être une preuve en faveur de l'action de l'ion par fixation sur l'enzyme. D'autre part, on pourrait interpréter le fait d'une concentration optimum

(1) ROCHE (J.) et NGUYEN VAN THOAI.— *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, 25, 1365.

de l'effecteur comme une saturation de l'enzyme par l'ion effecteur.

Le cuivre. — L'ion cuivre a été étudié comme effecteur ; il semble qu'il agisse surtout par dénaturation des protéines des enzymes : cette action porte donc sur le caractère protéique de l'enzyme plutôt qu'elle n'exerce une influence spécifique ainsi que l'a signalé Mlle LAURENS (1). Cependant, nous étudierons l'action du cuivre qui est considéré généralement comme un inhibiteur puissant. Le cuivre est utilisé sous forme de sulfate de cuivre 0,001 M ; les conditions étaient les mêmes que celles que nous avons employées jusqu'alors, toutefois la durée d'hydrolyse à 37° a été de 6 heures :

48 heures de macération :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7,3	8,1	9,1	10	11
P % (sans Cu)	14	25	42	21	5
P % (avec Cu)	3	7,5	20	7,5	2

Le tableau précédent indique que l'ion cuivre est fortement inhibiteur de la phosphomonoestérase alcaline du thymus.

Toutefois, des études, faites sur des taux très faibles de cuivre (M. 10^{-5}), nous ont donné pour le pH 9,1 une légère activation alors que, pour des taux de 0,01 M, le résultat marquait une forte inhibition :

48 heures de macération :

24 heures d'hydrolyse à 37° :

	Avec cuivre 0,001 M	Sans cuivre	Avec cuivre M. 10^{-5}
P %	44,5	84,9	89,1

(1) Mlle LAURENS (A.). — *Thèse Doctorat Etat Pharmacie*, 1942 27.

Le fer. — L'ion fer est généralement inhibiteur de la phosphomonoestérase A_1 de la plupart des organes, bien que BAMANN et HEUMULLER (1) lui trouvent une action activatrice. Pour certains auteurs (2), le fer peut se comporter comme un activateur faible, si sa concentration est suffisamment basse ; nous n'avons pu observer ce fait, même sur des préparations purifiées par dialyse. L'ion fer a été utilisé sous forme de sulfate ferreux en solution 0,01 M ; nous avons obtenu les résultats suivants :

48 heures de macération :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7	8	8,7	9,1	9,8	10,8
P % (sans Fe)	11	23	37	43	25	7
P % (avec Fe)	7	16	27	30	20	5

La phosphomonoestérase A_1 du thymus est donc faiblement inhibée par l'ion fer.

Le zinc. — L'ion zinc est généralement considéré comme un inhibiteur de la phosphomonoestérase A_1 (3). Il est utilisé sous forme de sulfate de zinc 0,01 M ; nous avons obtenu les résultats suivants :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7,6	8,5	9	9,3	9,7	10,4
P % (sans Zn)	15	21	30	25	18	5
P % (avec Zn)	11	14	19	15	12	4

Le zinc exerce donc une action inhibitrice sur la phosphomonoestérase A_1 du thymus comme sur les

(1) BAMANN (E.) und HEUMULLER. — *Naturw.*, 1940, **28**, 535.

(2) MASSART (L.) und VANDENDRIESCHE (L.). — *Naturw.*, 1940, **28**, 143.

(3) ROCHE (J.) et NGUYEN VAN THOAI. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 1365.

enzymes correspondants dans les autres organes. Nous avons étudié l'influence du zinc sur la cinétique de la réaction ; la détermination du rapport V du phosphore libéré au temps mis pour le libérer, au pH 9,1, nous donnera un chiffre que nous pourrons comparer avec ceux obtenus dans des conditions semblables avec la réaction sans effecteur et avec le magnésium :

Temps (minutes)	5	10	20	60	90	120
Phosphore (mg. par litre)	50	70	80	90	110	130
V.	10	7	4	3	1,2	1,1

(Voir courbe page 62).

Le zinc abaisse, d'une façon notable, la vitesse de réaction de la phosphomonoestérase A_1 du thymus, puisque celle-ci atteint, sans effecteur, le chiffre 7 comme limite en 60 minutes. Ceci peut être dû à la formation d'une combinaison stable Zn-Enzyme qui fixe le substrat S en une combinaison S-Zn-Enzyme difficilement dissociable.

b) LES ANIONS.

L'action des ions fluor, cyanogène et oxalique a été successivement étudiée. Celle des deux premiers doit être rapportée à la formation de complexe avec les métaux des enzymes.

Le fluorure. — L'action du fluor sur les phosphatases a été découverte par INOUE (1) sur les phosphatases acides et étendues par KAY (2) aux enzymes alcalins. La phosphomonoestérase alcaline A_1 a une sensibilité, vis-à-vis de l'ion fluor, variable selon les tissus qui la contiennent. Dans le cerveau et les hématies, cet

(1) INOUE (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1927, 7, 433.

(2) KAY (H-D.). — *Biochem. J.*, 1928, 22, 855.

enzyme est inhibé par l'ion fluor alors qu'il ne l'est pas dans le rein et le sérum, d'après les travaux de BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI (1) et MUNEMURA (2). En général l'ion fluor se révèle comme un inhibiteur peu énergétique des phosphomonoestérases (3).

L'action du fluor, à l'état de fluorure de sodium 0,01 M, sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium par la phosphomonoestérase A_1 du thymus, donne les résultats suivants :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7,3	8,65	8,9	9,1	9,7	10,7
P % (sans fluor) .	10	27	32	35	27	4
P % (avec fluor):	1	4	14	21	11	0

L'inhibition, par l'ion fluor, de la phosphomonoestérase A_1 est donc assez nette dans le thymus.

Nous avons étudié la cinétique de la réaction en présence de l'ion fluor ; le tableau suivant a été formé :

Temps (minutes)	5	15	30	60	120
Phosphore (mg. par litre)	220	268	300	360	720
V.	44	17,8	10	6	6

La vitesse de réaction est légèrement plus faible que dans le cas de la réaction sans effecteur (voir courbe page 62).

Le cyanure. — L'anion cyanogène a été considéré comme sans action sur les phosphatases par ROBISON. Cependant de nombreux auteurs, en particulier CLOE-

(1) BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — *Biochem. J.*, 1935, 29, 517.

(2) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, 17, 343.

(3) MASSART (L.) und DUFAIT (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1942, 272, 157.

TENS, MASSART et DUFALT (1), Mlle de LAROMIGUIÈRE (2) le considèrent comme inhibiteur. Ce fait doit être rapporté à la formation de complexes avec le ou les métaux des enzymes.

L'ion cyanogène est utilisé sous forme de cyanure de potassium 0,01 M. Les conditions d'expérience sont toujours les mêmes ; nous avons obtenu les résultats suivants :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7,5	8,7	9,1	9,6	10,9
P % (sans l'ion cyanogène) .	20	27,2	35,5	17,2	5,7
P % (avec l'ion cyanogène) .	17,3	20	24,1	10,1	5,3

Pour le thymus, l'ion cyanogène inhibe donc nettement la phosphomonoestérase A_1 .

L'oxalate. — L'anion oxalique est un inhibiteur général des phosphatases alcalines, plus puissant même que l'ion fluor. Son action a été constatée par MUNEMURA (3). Il n'aurait pas d'action cependant sur la phosphomonoestérase alcaline du foie et du rein. Pour étudier cet anion, nous avons utilisé une solution d'oxalate de potassium à la concentration centimolaire et l'hydrolyse a été faite pendant 3 heures à 37°, elle nous a conduit au tableau suivant :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7	7,7	8,5	9,1	9,7	10,4
P % (sans effecteur) .	12	17	27	32	27	14
P % (avec effecteur) .	10	15	22	25	20	9

(1) MASSART (I.) und Dufalt (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1942, **272**, 157.

(2) Mlle de LAROMIGUIÈRE (S.). — *Thèse doct. Univ. (Pharmacie) Marseille* 1942.

(3) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.

L'action de l'anion oxalique sur la phosphomono-estérase A_1 du thymus est inhibitrice. Cependant l'inhibition n'est pas aussi forte qu'on l'a signalée dans d'autres tissus.

c) LES CORPS ORGANIQUES.

Nous avons examiné successivement : la vitamine C, l'acide cholique, l'alanine, la cystine et le cholestérol.

La vitamine C. — L'action de la vitamine C ou acide ascorbique est très controversée. Inhibitrice pour certains auteurs (1), son rôle serait activateur pour d'autres (2), alors que ALBERS (3) la considère comme inefficace.

Nous avons étudié la vitamine C à des concentrations différentes, pour nous rendre compte si nous n'étions pas en présence d'un effecteur à action tantôt activateur, tantôt inhibitrice, ainsi que nous l'avons déjà envisagé à propos du magnésium. Les concentrations sont exprimées en g. par litre, dans chaque cas le pH a été ajusté à 9,1 :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

Concentration en vitamine C.....	0	0,2	0,4	1	2	5	10
P %	37	37	39	52	63	40	30

Ces résultats nous montrent que l'action de la vitamine C passe par un maximum d'activité quand

(1) EULER et SVENSON. — Cité d'après OPPENHEIMER (C.). — *Die Fermente und ihre Wirkungen*. Supplément., Lief 1 et 2, W. Junk, éd., La Haye, 1935, 98-170.

(2) KING (E.-J.) and DELORY (G.-E.). — *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1157.

(3) ALBERS (H.). — *Handbuch der Enzymologie*. Akad. Verlagsges., éd., Leipzig, 1940, 408-479.

la concentration atteint 2 g. par litre ; cette action est relativement élevée ; elle est légèrement inhibitrice pour des concentrations de 10 g. par litre.

L'acide cholique. — Comme tous les acides biliaires, l'acide cholique s'est révélé effecteur des phosphatases (1) : leur rôle est généralement inhibiteur. La concentration utilisée était centimolaire. La phosphomonoestérase A₁ du thymus nous a donné les résultats suivants :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7,7	8,3	9	9,6	10,4
Sans effecteur .	18,7	26	32	21	11,3
Avec effecteur .	13	15	17	11	4

L'acide cholique est donc un effecteur nettement inhibiteur de la phosphomonoestérase A₁ du thymus. Nous avons vérifié, d'autre part, que cette inhibition semble d'autant plus forte que la concentration en acide cholique est plus grande.

L'alanine. — Les acides aminés ont un maximum d'activité pour une concentration qui est comprise entre 0,01 et 0,0001 M (2) ; en dehors de cette zone, ils sont moins activateurs puis inhibiteurs.

Nous avons étudié l'alanine en solution centimolaire :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7,3	8	8,7	9,1	9,7	10,4
P % (sans effecteur) ..	14	19	29	33	26	10
P % (avec alanine) ...	13	24	33	38	30	10,5

(1) BODANSKY (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, **115**, 101.

(2) BODANSKY (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, **114**, 273.

A cette concentration, l'alanine montre un pouvoir légèrement activateur, mais celui-ci est trop faible pour arriver à une conclusion certaine.

La cystine. — La plupart des thiols et de leurs dérivés exercent une action sur la phosphomonoestérase A_1 . Nous avons étudié la cystine qui est le disulfure résultant de l'oxydation de la cystéine. La cystine donne ce dérivé dans les réactions d'oxydo-réduction. D'après LOHMANN (1), la cystine serait faiblement inhibitrice au pH 7,4. WALDSCHMIDT-LEITZ, WEILL et PURR (2), étudiant l'hydrolyse des acides glycérophosphoriques, adénylpyrophosphorique, créatinephosphorique et thymonucléinique par un extrait de rein, ont observé que cette réaction était ralentie par H_2S et la cystéine mais non par la cystine au pH 9,0. KOSTER et BERSIN (3) n'ont pu reproduire ces résultats. Nous avons examiné l'action de la cystine sur le thymus dans les mêmes conditions que pour l'alanine ; nous avons obtenu les résultats suivants :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7,1	8,2	8,8	9,1	9,7	10,2	11
P % (sans effecteur) ..	14	20	30	35	25	11	2
P % (avec cystine ...)	13	18	27	33	24	9	1

Ce corps est donc sans action sur la phosphomonoestérase A_1 du thymus.

Le cholestérol. — L'étude de l'action du cholestérol est difficile par suite de sa faible solubilité ; nous

(1) LOHMANN (K.). — *Biochem. Z.*, 1933, **262**, 157.

(2) WALDSCHMIDT-LEITZ (E.), WEILL (L.) und PURR (A.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1933, **215**, 64.

(3) KOSTER (H.) und BERSIN (Th.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **231**, 153.

avons utilisé une solution alcoolique à 1 %. Quand on étend cette solution par un milieu aqueux, il se produit une émulsion stable. Nous avons dilué la solution alcoolique par le mélange de produit de macération du thymus et de solution de glycérophosphate de façon à obtenir une concentration en cholestérol égale à 1 ‰ :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7,3	8,2	9,1	9,7	10,2	11,3
P % (sans effecteur) ..	8	15	27	25	4	1
P % (avec cholestérol)	7	15	26	22	4	1

Le cholestérol est donc sans action sur la phospho-monoestérase A₁ du thymus.

d) LES COUPLES EFFECTEURS.

Nous allons envisager les effecteurs associés sous forme de couple : la vitamine C et l'ion cuivre, l'alanine et l'ion zinc, la cystine et l'ion fer.

Le couple vitamine C - cuivre. — L'ion cuivre facilite l'oxydation de la vitamine C en acide déhydroascorbique. Nous avons utilisé le cuivre à la faible concentration de 0 g. 002 par litre, et nous avons fait varier la concentration en vitamine C, le pH étant de 9,1 :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

Vitamine C (g. ‰) ...	0	1	2	5	10
P % (sans cuivre)	38	55	64	60	42
P % (avec cuivre)	40	29	24	24	20

Nous retrouvons ici le résultat obtenu dans les mêmes conditions lors de l'étude de la vitamine C agissant isolément. Dans la deuxième partie du tableau,

en présence de cuivre à faible concentration, nous avons constaté une inhibition d'autant plus forte que la teneur en vitamine C était plus élevée. Ce fait est en faveur de l'hypothèse d'un couple vitamine C et cuivre.

Le couple alanine-zinc. — L'ensemble alanine-zinc jouerait un rôle inverse de celui du zinc pris séparément. HOVE (1) et ses collaborateurs avaient remarqué que le zinc agissait différemment suivant que la phosphatase était brute ou dialysée. Ils interprétaient ce fait par l'élimination d'un coactivateur du zinc par la dialyse. Ce co-activateur serait un des acides α -aminés. Nous avons repris ces expériences pour la phosphomonoestérase A_1 du thymus, sur le produit de 2 jours de macération, dialysé ; nous avons obtenu les résultats suivants au pH 9,1, avec une concentration en zinc et en alanine de 0,01 M :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

Effecteur	Néant	Zn	Alanine	Zn — Alanine
P %	30	5	36	6

Nous avons déduit de ces résultats que le zinc exerce son rôle d'effecteur comme s'il était seul ; l'alanine ne modifie pas son action.

Le couple cystine-fer. — L'ensemble cystine-fer II donne une action inhibitrice par suite de la réduction de la cystine en cystéine qui est inhibitrice. Nous

(1) HOVE (E.), ELVEHJEM (C-A.) and HART (E-B.). — *J. biol. Chem.*, 1940, **134**, 425.

avons donc essayé l'action de ce couple, comme précédemment, au pH 9,1 :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

Effecteur	Néant	Fer	Cystine	Cystine-fer
P %	32	13	27	16

Les résultats trouvés sont semblables à ceux que nous avons avec l'ensemble alanine-Zn : le fer agit comme s'il était seul.

L'étude de la phosphomonoestérase A_1 alcaline du thymus a permis de définir son pH optimum qui est de 9,1 ; l'étude de la cinétique de la réaction nous a montré que la vitesse, très grande au début, tendait rapidement vers une limite atteinte en une heure, imite plus élevée en présence de magnésium, plus faible par contre dans le cas du zinc. Certains éléments, tels que le magnésium, le manganèse et, à des taux beaucoup plus réduits, le calcium, activent cette réaction ; le zinc, le fer, le cuivre, les fluorures et les cyanures, au contraire, ont une action inhibitrice.

B. — Etude de la phosphomonoestérase A_2 .

1°) **L'enzyme.** — La phosphomonoestérase acide A_2 se trouve, dans la nature, répartie dans la plupart des organes animaux et végétaux, on connaît en particulier :

la phosphomonoestérase A_2 :

du cerveau de pH optimum	5,0	(1)
de la prostate de pH optimum	4,65	(2)

(1) GIRI (K-V.) et DATTA (N-C.). — *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1089.

(2) KUTSCHER (W.) et WORNER (Ä.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **239**, 109.

de la salive de pH optimum.....	5,0	(1)
des hématies de pH optimum	5,8	(2)
de foie de pH optimum	5,5	(2)
de pomme de terre de pH optimum	5,85	(3)
de betterave de pH optimum	5,85	(3)
de soja de pH optimum.....	5,2	(4)
de graines d'amandes de pH optimum	5,6-5,8	(5)
de graines de moutarde blanche de pH optimum ...	5,6-5,8	(5)
de l'urine, de pH optimum	5,8	(6)

Elle ferait défaut dans certains organes tels que l'aorte et le cartilage hyalin. ROBISON et SOAMES (7) l'ont découverte et ont émis l'hypothèse qu'il pouvait y avoir une phosphatase, différente de la phosphomonoestérase A_1 alcaline et hydrolysant les monoesters phosphoriques. BAMANN et DIEDERICHs (8) ont séparé la phosphomonoestérase A_2 acide, de la phosphomonoestérase A_1 alcaline, par inactivation sélective au moyen des ions H^+ , apportant ainsi la preuve formelle de l'existence des deux phosphatases. COURTOIS l'a mise en évidence dans divers organes végétaux, en particulier dans les graines (amandes, moutarde).

Son pH optimum est de 5,5 ; selon les organes, il peut varier légèrement entre 4,8 et 5,7. Dans le thymus, la détermination du pH optimum a été précisée en effectuant des mesures d'hydrolyse à des pH différents et tamponnés, après un séjour à l'étuve à

(1) GIRI (K.-V.). — *Biochem. Z.*, 1936, **285**, 306.

(2) Mlle BAUDOUIN (J.). — *Thèse Doctorat Etat Pharmacie*, Marseille, 1943.

(3) PFANDKUCH (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **241**, 34.

(4) GIRI (K.-V.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1937, **245**, 185.

(5) COURTOIS (J.). — *Thèse Doctorat Sciences physiques*, Paris, 1938.

(6) BIGET (P.). — *Thèse Doctorat Université Pharmacie*, Paris, 1943.

(7) ROBISON (R.) et SOAMES (K.-M.). — *Biochem. J.*, 1924, **18**, 740.

(8) BAMANN (E.) und DIEDERICHs (K.). — *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1934, **67**, 2019.

37° durant six heures, par suite de l'intensité plus faible de cet enzyme A_2 dans le thymus ; les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

48 heures de macération :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	4,7	4,8	5,0	5,2	5,5	5,7	5,9	6,1
P %	18	19	22	26	28	27	25	23

Le pH optimum de la phosphomonoestérase A_2 acide est donc 5,5 pour le thymus.

L'hydrolyse provoquée par cet enzyme est bien plus lente que celle catalysée par la phosphomonoestérase A_1 et, partant, la cinétique de la réaction est plus faible.

2°) **Les effecteurs.** — Nous avons étudié, à propos de la phosphomonoestérase A_2 , l'action des effecteurs : le plan adopté, calqué sur celui suivi pour l'enzyme A_1 , envisage tout d'abord l'action des différents cations : le magnésium, le manganèse, le calcium, le zinc, le fer et le cuivre, puis l'action des anions, enfin les composés organiques et certains complexes tels que la vitamine C et le cuivré, l'alanine et le zinc.

a) LES CATIONS.

Le magnésium. — L'action du magnésium sur la phosphomonoestérase A_2 serait peu sensible ou même insensible, d'après GIRI (1), BAMANN et ses collaborateurs. DAVIES (2) constate un effet inhibiteur dans les organes animaux, fait confirmé par ROCHE (3) et ses élèves dans les champignons. Toutefois MUNEMURA (4) considère le magnésium comme un activateur de la phosphomonoestérase A_2 .

(1) GIRI (K-V.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1937, **245**, 185.

(2) DAVIES (D-R.). — *Biochem. J.*, 1934, **28**, 529.

(3) ROCHE (J.) et NGUYEN VAN THOI. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 1237.

(4) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.

Le magnésium est utilisé en solution de sulfate de magnésium 0,01 M. Nous opérons sensiblement dans les mêmes conditions que pour l'étude de la phosphomonoestérase A_1 après dialyse ; les résultats donnés par le liquide de macération sont les suivants :

48 heures de macération :

3 heures d'étuve à 37° :

pH	2	3,2	4	5,1	5,7	6	7
P % (sans effecteur) ...	0	2	7	13	15	12	10
P % (avec magnésium)	0	2	8	17	19	15	20

La phosphomonoestérase A_2 du thymus est légèrement activée par le magnésium (voir la courbe page 64).

Le manganèse. — Pour le manganèse les mêmes techniques sont utilisées que dans le cas de la phosphomonoestérase A_1 ; nous avons obtenu le tableau suivant :

48 heures de macération :

3 heures d'étuve à 37° :

pH	1,8	3,1	4,2	5,6	6,2	6,9
P % (sans effecteur)	0	3	9	16	11	10
P % (avec manganèse) .	0	4	13	20	16	15

Le manganèse est donc légèrement activateur de la phosphomonoestérase A_2 du thymus ; son effet est comparable à celui du magnésium.

Le calcium. — Cet ion est introduit sous forme d'acétate à la concentration 0,001 M ; les résultats suivants ont été trouvés dans les mêmes conditions d'hydrolyse que précédemment :

48 heures de macération :

3 heures d'étuve à 37° :

pH	2	3	4	5	5,6	6	7
P % (sans effecteur) ..	0	1	3	8	16	12	16
P % (avec calcium) ...	0	1	3	10	19	16	14

Le calcium semble avoir un effet légèrement activateur.

Le zinc. — L'ion zinc a été utilisé sous forme de sulfate 0,01 M et, après 3 heures d'étuve à 37°, nous avons eu le tableau suivant :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	2,5	3,5	4,6	5,5	6,3	7
P % (sans zinc)	0	3	9	16	13	17
P % (avec zinc) ...	0	2	5	7,2	6	11,2

Le zinc est assez fortement inhibiteur de la phosphomonoestérase A₂ du thymus ; l'action du zinc sur la phosphomonoestérase A₂ est retrouvée dans la plupart des organes étudiés.

Le fer. — BAMANN et HEUMULLER (1) ont signalé que l'ion fer II était inhibiteur de la phosphomonoestérase A₂. Nous avons recherché ce résultat sur l'enzyme A₂ du thymus. Avec le fer, à la concentration 0,01 M, nous avons trouvé l'ensemble des résultats suivants :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	2	3	4	5,6	6	6,3
P % (sans fer)	1	2	9	16	12	10
* P % (avec fer)	0	1	6	12	9	7

Le fer II est donc légèrement inhibiteur de la phosphomonoestérase A₂ du thymus.

Le cuivre. — Selon GIRI (2), l'ion cuivre serait inhibiteur des phosphomonoestérases A₂ de la plupart des

(1) BAMANN (E.) und HEUMULLER (E.). — *Naturw.*, 1940, **28**, 535.

(2) GIRI (K-V.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1937, **245**, 185.

tissus. Nous l'avons essayé sur celle du thymus dans les mêmes conditions que pour la phosphomonoestérase A_1 de cet organe, avec le sulfate de cuivre 0,01 M à 37°. Nous avons obtenu le tableau ci-après :

48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	1,8	3	4,3	5,6	6,3	7
P % (sans cuivre)	0	2	10	16	14	13
P % (avec cuivre)	0	1	7	12	9	10

Le cuivre a donc un effet inhibiteur.

b) LES ANIONS.

Le fluorure. — Selon GIRI, le fluor inhibe fortement la phosphomonoestérase A_2 dans la plupart des organes animaux tels que le cerveau, la prostate ou le foie ; ce caractère se retrouve également dans le règne végétal, dans l'étude de la phosphomonoestérase A_2 du riz, de la pomme de terre et de la betterave sucrière.

L'ion fluor a été utilisé sous forme de fluorure de sodium 0,01 M dans les mêmes conditions que pour les cations :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	2,3	3,1	4,4	5,1	5,6	6,3	7
P % (sans effecteur) ..	0	2	7	10	15	13	15
P % (avec fluorure) ..	0	1	1	3	5	2	4

Le fluor inhibe donc fortement la phosphomonoestérase acide du thymus.

Le cyanure. — D'après certains auteurs, l'anion

cyanogène serait sans action. Nos essais ont porté sur le cyanure de potassium à 0,01 M :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	4,3	5,2	5,7	6,3	7,2
P % (sans cyanure)	2	8	13	17	13	15
P % (avec cyanure) 0,01 M	0	2	7	11	7	12

Nous trouvons donc, dans le cas du thymus, une inhibition appréciable sous l'action de cet effecteur.

L'oxalate. — BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI (1) ont montré que l'anion oxalique inhibait la phosphomonoestérase A₂ du foie de lapin ; MUNEMURA (2) remarque qu'il n'aurait pas d'action appréciable dans le cas du son de riz. Nous avons essayé cet anion sur l'enzyme A₂ du thymus sous forme d'oxalate de potassium à 0,01 M :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	2,1	3	4,2	5	5,6	6,3	7,2
P % (sans oxalate)	1	2	6	9	15	12	18
P % (avec oxalate) ...	0	1	1	3	6	2	4,7

Comme BELFANTI et ses collaborateurs, nous trouvons, pour l'anion oxalique, une action inhibitrice sur la phosphomonoestérase acide du thymus qui est d'ailleurs très nette.

c) LES CORPS ORGANIQUES.

La vitamine C. — La vitamine C serait sans action sur la phosphomonoestérase A₂, fait signalé par KING et DELORY (3) dans le sérum et le plasma ; ces derniers,

(1) BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) et ERCOLI (A.). — *Biochem. J.*, 1953, **29**, 517.

(2) MUNEMURA. — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.

(3) KING (E-J.) and DELORY (H-D.). — *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1157.

utilisant le microdosage du phosphore par la méthode de Briggs, ont obtenu les résultats suivants (exprimés en unités Bodansky) par action de 5 mg. d'acide ascorbique sur le sérum ou le plasma :

	Sans vitamine C	Avec vitamine C
Sérum (0 cc. 2)	5,0	5,0
Plasma (0 cc. 5)	3,6	3,6

Nous utilisons la vitamine C à la concentration de 2 g. par litre, concentration qui nous avait donné le maximum d'activité lors de l'étude de la phosphomonoestérase A₁.

Pour le produit frais de macération de thymus et les poudres acétoniques, nous trouvons des résultats analogues :

Produit frais de macération de thymus (48 heures) :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	1,8	2,6	3,9	5	5,6	6,3
P % (sans vitamine C) .	0	2	4	10	17	14
P % (avec vitamine C) .	0	2	5	12	16	13

Poudres acétoniques de thymus :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	1,5	2	3,2	4,7	5,5	6,2	6,9
P % (sans vitamine C) 0	1	3	9	14	12	10	
P % (avec vitamine C) 0	0	4	11	15	12	11	

L'acide ascorbique semble donc ne pas influencer la phosphomonoestérase A₂ du thymus à la concentration de 2 g. par litre.

L'acide cholique. — L'acide cholique est, d'après Mlle BAUDOIN (1), faiblement inhibiteur de la phospho-

(1) Mlle BAUDOIN (J.). — *Thèse Doctorat Etat Pharmacie, Marseille, 1943.*

monoestérase A_2 dans le cas du foie ; nous avons cherché l'action de cet effecteur dans le cas du thymus :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	2	3	4,3	5,6	6,5	7,2
P % (sans acide cholique)	0	1	6,5	16,1	12	14
P % (avec acide cholique) 0,01 M	0	2	6	12	10,8	9

Nous avons donc retrouvé, pour la macération de thymus, le caractère inhibiteur sur la phosphomonoestérase acide, déjà signalé par Mlle BAUDOUIN.

L'alanine. — L'alanine semble avoir une action activatrice sur la phosphomonoestérase A_2 , d'une manière générale, quelle que soit son origine. Pour le thymus, nous avons fait un essai dans les conditions habituelles, nous avons obtenu le tableau suivant :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	1,7	2,9	4,3	5,2	5,6	6,3	7
P % (sans alanine) ...	0	2	7	10	16	14	13
P % (avec alanine) ...	0	3	9	12	21	17	15

Le résultat est donc une action activatrice même dans le cas du thymus.

Le cholestérol. — Le cholestérol a été étudié de la même façon que dans la phosphomonoestérase alcaline, après avoir été mis en solution alcoolique et après dilution de celle-ci afin d'obtenir une émulsion stable. Nous n'avons remarqué aucune action notable.

d) LES COUPLES EFFECTEURS.

Nous avons étudié ensuite les deux associations : vitamine C - cuivre et alanine - zinc.

Le couple vitamine C - cuivre. — L'enzyme A_2 est,

d'une façon générale, peu sensible à l'action du couple vitamine C - cuivre ainsi que plusieurs auteurs l'ont signalé (1). Nous avons fait un essai en utilisant le cuivre à la concentration de 0 g. 002 par litre et la vitamine C à celle de 2 g. par litre. Nous avons choisi cette dernière car c'est elle qui, lors de l'étude de la phosphomonoestérase A₁, nous avait donné le maximum d'hydrolyse :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	2	3,2	4,3	5,2	5,6	6,3	7,1
P % (sans le couple) .	0	2	9	14	17	14	13
P % (avec le couple)..	0	2	10	14	18	15	14

Ce couple a donc, à la concentration indiquée, sur la phosphomonoestérase A₂ du thymus une action pratiquement nulle. Les essais, faits avec d'autres concentrations, n'ont pas modifié ce résultat.

Le couple alanine - zinc. — Avec le couple alanine - zinc, à la concentration 0,01 M, les déterminations, effectuées sur des préparations brutes ou dialysées, nous ont conduit à des résultats comparables, le pH étant de 5,6 et le temps d'hydrolyse, à 37°, de trois heures :

Effecteur	Néant	Zinc	Alanine	Alanine-zinc
P %	17	9	20	10

Le couple agit donc comme si le zinc était seul.

En résumé, l'étude de la phosphomonoestérase-acide A₂ du thymus nous a permis de définir son pH opti-

(1) COURTOIS (J.) et Mlle MANOUVRIER (J.). — *Enzymologia*, 1939, 6, 342.

PFANDKUCH (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, 241, 34.

mum d'action : celui-ci est de 5,5. Elle est sensible à l'action des effecteurs, en particulier le magnésium et le manganèse qui augmentent son activité, tandis que le fluorure et l'oxalate ont une action inhibitrice. Toutefois, quel qu'en soit leur sens, ces variations restent faibles et nous n'avons jamais obtenu avec l'enzyme acide des écarts aussi importants que ceux retrouvés avec l'enzyme alcalin.

Le système phosphomonoestérasique est donc dominé surtout par la phosphatase alcaline : celle-ci se libère rapidement et a une grande activité, l'action de la phosphatase acide est, par contre, beaucoup plus faible.

CHAPITRE IV

LE SYSTÈME PYROPHOSPHATASIQUE DU THYMUS.

Dans le règne animal, NEUBERG et WAGNER (1) ont, en 1926, montré la présence, dans les extraits de rein de cheval, d'enzyme hydrolysant les esters pyrophosphoriques. KAY (2) a signalé la présence de pyrophosphates dans les tissus animaux et végétaux et la répartition des pyrophosphatases, parallèle à celle des phosphomonoestérases. Par ailleurs, ROCHE (3) a prouvé l'existence de pyrophosphatases dans les hématies, le sérum, les globules blancs et les os ; Mlle de LAROMIGUIÈRE (4) les a retrouvées dans la muqueuse intestinale de chien. On a signalé leur présence dans la bile, les sucs pancréatique et intestinaux, le lait, etc... Dans le règne végétal, NEUBERG et WAGNER (1) ont

(1) NEUBERG-(C.) et WAGNER (J.). — *Biochem. Z.*, 1926, **171**, 485.

(2) KAY (H-D.). — *Biochem. J.*, 1928, **22**, 1146.

(3) ROCHE (J.). — Cité d'après Mlle DURAND (J.). — *Thèse Doctorat Pharmacie*, Marseille, 1943.

(4) Mlle de LAROMIGUIÈRE (S.). — *Thèse Doctorat Pharmacie*, Marseille, 1942.

retrouvé des pyrophosphatases dans la takadiastase, les levures basses et de nombreux basidiomycètes. TAPADHINAS (1) les a caractérisées dans les feuilles vertes. Comme les autres phosphatases, elles feraient défaut dans certains tissus tels que le cartilage hyalin et l'aorte.

Le thymus s'est révélé actif sur les solutions de pyrophosphate de sodium. Nous avons utilisé nos techniques générales à partir de poudres acétoniques ainsi que de produits de macérations de 48 heures.

Les pyrophosphatases peuvent se classer, comme les phosphomonoestérases, en enzymes isodynames, mais en trois groupes seulement que l'on distingue par leur pH optimum d'action :

— la pyrophosphatase A_1 , dite alcaline, de pH optimum voisin de 8 ;

— la pyrophosphatase A_2 , dite acide, de pH optimum voisin de 5,6 ;

— la pyrophosphatase A_3 , dite très acide, de pH optimum voisin de 4.

A chaque valeur de pH optimum des diverses pyrophosphatases, on retrouve une phosphomonoestérase correspondante, toutefois on ne connaît pas de pyrophosphatase A_4 alors que l'on a signalé une phosphomonoestérase A_4 .

C'est KURATA (2) qui, en 1931, obtint, à partir d'un extrait de rein, une pyrophosphatase de pH optimum 4. D'après TAKAHASHI (3), il existerait dans le rein deux pyrophosphatases : l'une de pH optimum 4 et l'autre 9 ; dans le son de riz, il aurait découvert une troisième pyrophosphatase de pH optimum 5. MUNEMURA (4)

(1) TAPADHINAS (J.). — *C. R. Soc. biol.*, 1930, **105**, 811.

(2) KURATA. — *J. Biochem. Japan*, 1931, **14**, 25.

(3) TAKAHASHI. — *J. Biochem. Japan*, 1932, **16**, 463.

(4) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.

Dans le cas de la poudre acétonique, nous avons obtenu, dans les mêmes conditions, les valeurs suivantes :

pH	2,9	4,3	5,2	6,1	6,4	6,7	7,1	7,6	8,3	8,8	9,1
P % (3 heures) ...	0	7	12	3	10	11	14	20	32	17	4
P % (24 heures) ...	5	35	37	34	32	30	32	35	58	42	23

L'ensemble de ces faits nous permet d'affirmer la présence de deux pyrophosphatases dans le thymus. Les résultats du produit frais de macération étant légèrement supérieurs à ceux de la poudre acétonique : ceci doit être rapporté à l'altération des enzymes par le traitement à l'acétone. Nous avons donc trouvé, dans le thymus, les pyrophosphatases A_1 alcaline et A_2 acide, de même qu'au point de vue phosphomonoestérasiqne, nous avons trouvé les deux phosphomonoestérases A_1 alcaline et A_2 acide. La présence de la pyrophosphatase A_3 , très acide, n'a pu être prouvée ; nous avons indiqué que la présence de la phosphomonoestérase A_3 , très acide, était contestable dans le thymus.

L'hydrolyse chimique du pyrophosphate a été étudiée en fonction du pH et du temps. En effet, suivant que le milieu devient très acide ou très alcalin, cette hydrolyse peut venir s'ajouter à l'hydrolyse enzymatique et le pyrophosphate peut se dédoubler spontanément en deux molécules d'orthophosphate. Toutefois, dans les conditions d'expérience, cette hydrolyse est pratiquement nulle.

A) Etude de la pyrophosphatase A_1 .

1^o) **L'enzyme.** — Cet enzyme a été trouvé dans un certain nombre d'organes et, dans la plupart des cas, simultanément avec la phosphomonoestérase A_1 .

ROCHE, Mlle de LAROMIGUIÈRE et Mlle LAURENS (1) ont caractérisé cette pyrophosphatase dans la muqueuse intestinale, le tissu hépatique, le rein, les os. ROCHE l'a isolé dans la plupart des tissus animaux. Récemment, BESSOLES (2) l'a signalée dans la capsule surrénale.

Le pH optimum de cet enzyme, dans les divers organes, oscille entre 7,2 et 8,3 ; nous avons cherché quel était celui de la pyrophosphatase A₁ du thymus. Pour cela, nous avons étudié l'hydrolyse à des pH assez rapprochés et en milieux tamponnés. Le temps d'étuve à 37° a été de trois heures afin d'avoir une hydrolyse enzymatique du pyrophosphate notable ; nous avons obtenu les résultats suivants :

pH ...	7,6	7,8	8,0	8,2	8,4	8,6	8,8
P % .	21,4	28	34	36,1	34	31,2	27

La pyrophosphatase A₁ alcaline du thymus a donc pour pH optimum d'action 8,2.

Nous avons traité par l'ammoniaque N/40 la pulpe et la poudre acétonique, nous avons obtenu les résultats suivants :

a) Avec le produit frais, 48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH ...	1,8	3	4	4,7	5,2	5,7	6,3	7,5	8,1	9	10	11
P % .	0	0	1	3	5	7	14	28	33	20	6	0

b) Avec la poudre acétonique, après 30 minutes d'agitation mécanique, en présence de solution ammo-

(1) ROCHE (J.), Mlle de LAROMIGUIÈRE (S.) et Mlle LAURENS (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 1157.
 (2) BESSOLES (H.). — *Thèse Doctorat Université Pharmacie, Montpellier*, 1944.

niacale N/40, pour permettre la mise en solution des enzymes :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH ...	2	3,5	4,5	5,1	5,6	6,3	6,8	7,6	8,1	9,1	10	11
P % ..	0	0	0	5	7	13	20	26	30	19	4	0

Par la solution ammoniacale, nous avons inactivé l'enzyme acide et la seule activité pyrophosphatasique de nos milieux est due, dans ces cas, à la pyrophosphatase A₁ alcaline ; c'est un procédé de purification que nous avons signalé plus haut et qui trouve ici une application.

2^o) **Cinétique de la réaction sans effecteur.** — Nous avons étudié la cinétique de la réaction pyrophosphatasique, en utilisant la même méthode tenant compte de la valeur du rapport V du phosphore libéré au temps mis pour le libérer, le phosphore étant exprimé en mg. et le temps en minutes :

temps .	10	20	30	60	120	180	240
P. (mg.)	225	362	455	541	603	633	741
V.	22,5	18	15	9	5	3,5	3,5

Les résultats de ce tableau montrent une vitesse de réaction beaucoup plus faible que dans le cas des phosphomonoestérases (voir courbe page 97).

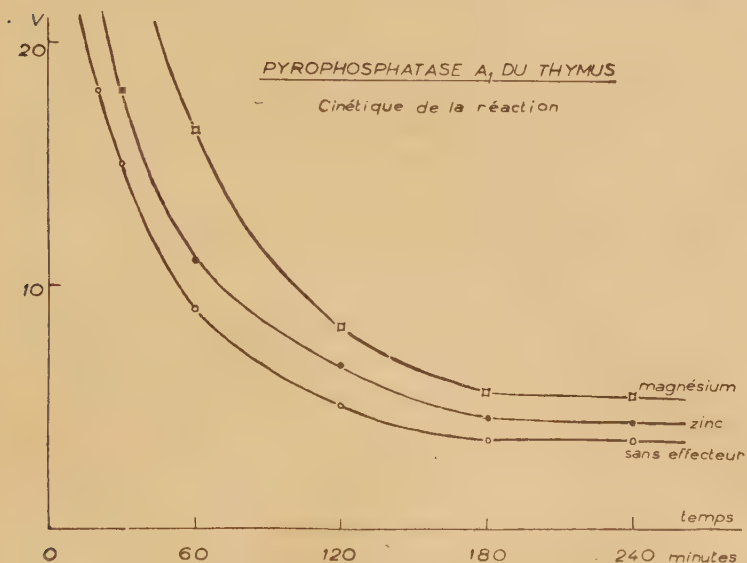
3^o) **Les effecteurs de la pyrophosphatase A₁.** — L'action des différents effecteurs envisagés à propos des phosphomonoestérases a été étudiée vis-à-vis de la pyrophosphatase A₁.

a) LES CATIONS.

Le magnésium. — BAMANN, HEUMULLER (1) et leurs

(1) BAMANN (E.) und HEUMULLER. — *Naturw.*, 1940, 28, 535.

collaborateurs, en étudiant l'action du magnésium sur la pyrophosphatase A_1 hépatique, ont constaté qu'il jouait un rôle activateur ; ce rôle, important avec la phosphomonoestérase A_1 , est plus réduit dans le cas de la pyrophosphatase alcaline. Le magnésium est



utilisé sous forme de sulfate de magnésium 0,01 M. La pyrophosphatase alcaline a été employée sous forme de liquide de macération de l'organe frais et de la poudre acétonique :

Produit frais, 48 heures de macération :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	6,3	7,5	8,1	9	10	11
P % (sans effecteur)	19	28	33	20	6	0
P % (avec magnésium)	25	47	52	26	8	0

Poudre acétonique :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	6,5	7,7	8,1	9,1	10	11
P % (sans effecteur)	17	26	30	19	4	0
P % (avec magnésium)	21	42	50	29	5	0

L'ion magnésium est donc activateur de la pyrophosphatase A_1 du thymus : ceci confirme la remarque faite par Mlle LAURENS (1), suivant laquelle la pyrophosphatase A_1 serait activée par le magnésium quelle que soit son organe d'origine ; toutefois cette activation varie selon la concentration en activateur et, comme pour la phosphomonoestérase A_1 , nous avons recherché le q Mg optimum de la pyrophosphatase alcaline. Le pH des expériences était égal à 8,1 et le temps d'hydrolyse à 37°, de 3 heures, afin d'avoir un maximum net :

q Mg.	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	∞
P %	23	30	40	52	54	49	40	35	30	30

Ainsi, pour le thymus, le q Mg optimum est de 2,5. Le magnésium est inhibiteur pour un q Mg inférieur à 1, fait signalé par ROCHE et ses élèves (2) sur le rein et les globules blancs.

Cinétique de la réaction en présence de magnésium :

Nous avons étudié la vitesse de réaction en présence de magnésium avec les méthodes habituelles ; nous avons obtenu, au pH optimum 5,6, les résultats suivants :

Temps (minutes)	10	20	30	60	120	180	240
P. (mg.)	630	819	945	987	997	1008	1320
V.	63	40,9	31,5	16,4	8,3	5,6	5,5

(Voir Courbe page 97).

La cinétique de la réaction en présence de magnésium, comme dans le cas de la phosphomonoestérase A_1 ,

(1) Mlle LAURENS (A.). — *Thèse Doctorat Université Pharmacie, Marseille, 1942.*

(2) ROCHE (J.), Mlle LAURENS (A.) et Mlle de LAROMIGUIÈRE (S.). — *Bull. Soc. Chim. Biol., 1943, 25, 1157.*

a une limite plus élevée que dans la réaction sans effecteur ; toutefois, le temps pour atteindre cette limite est plus grand que celui mis par la phospho-monoestérase A_1 , ce qui prouve l'intensité plus faible de la pyrophosphatase alcaline.

Le manganèse. — D'après BAMANN (1), le manganèse n'aurait pas d'action sur la pyrophosphatase A_1 ; il en serait de même d'après ALBERS (2). Il serait activateur selon Mlle DURAND (3) qui attribue à une dialyse et à une purification insuffisantes des préparations l'insuccès d'ALBERS. Nous avons utilisé le manganèse à l'état de sulfate de manganèse en solution centimolaire :

Macération dialysée de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	6	7	7,5	8,2	9	10
P % (sans effecteur)	10	24	30	33	26	8
P % (avec manganèse)	6	18	22	27	23	7

Le manganèse serait ainsi légèrement inhibiteur de la pyrophosphatase A_1 du thymus.

Le calcium. — L'action de l'ion calcium sur la pyrophosphatase A_1 est discutée : pour Mlle DURAND, il serait sans action sur la pyrophosphatase et, Mlle LAURENS lui reconnaît un pouvoir activateur ainsi que TANNHAUSER (4). Selon BAMANN, l'ion calcium est sans action mais le mélange des ions calcium et magnésium serait inhibiteur et formerait un système antagoniste. Pour MUNEMURA (5), il serait indifférent

(1) BAMANN (E.). — *Naturw.*, 1940, **28**, 142, et *ibid.*, 3405.

(2) ALBERS (D.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1940, **266**, 1.

(3) Mlle DURAND (J.). — *Thèse Doctorat Université*, Marseille, 1943.

(4) TANNHAUSER (S.-J.), RIEDEL (M.) and GRATTAN (J.-F.). — *J. biol. Chem.*, 1937, **121**, 697.

(5) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.

à la pyrophosphatase A_1 . D'après KUWABARA (1), il activerait la phosphatase alcaline des cals des fractures et, pour KEESER (2), il serait antagoniste de l'ion magnésium.

On l'utilise sous forme d'acétate de calcium millimolaire comme précédemment pour la phosphomonoestérase ; nous avons eu les résultats suivants :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	6	7	7,7	8,2	9	10	11
P % (sans effecteur) ..	16	23	29	32	20	6	2
P % (avec calcium) ...	15	24	30	38	19	7	1

L'action du calcium sur la pyrophosphatase du thymus semble être légèrement activatrice ; mais cette influence est faible et comparable à celle que nous avons déjà trouvée lors de l'étude de la phosphomonoestérase alcaline du thymus.

Le zinc. — Nous avons fait l'essai du zinc sur la pyrophosphatase A_1 du thymus, en l'utilisant sous forme de solution centimolaire de sulfate de zinc ; nous avons obtenu le tableau suivant :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	6	7	7,5	8,2	9	10,3	11
P % (sans effecteur) ..	14	24	25	32	21	5	0
P % (avec effecteur) .	13	25	28	36	22	6	0

En conclusion, le zinc est légèrement activateur de la pyrophosphatase A_1 du thymus, alors qu'il exerçait une action inhibitrice sur la phosphomonoestérase A_1 .

(1) KUWABARA. — *J. Biochem. Japan*, 1932, 16, 403.

(2) KEESER. — Cité d'après OPPENHEIMER (C.). — *Die Fermente und ihre Wirkungen*. Supplément Lief, 1935, W. Junk, éd., La Haye, 1933.

Nous avons également étudié la cinétique de la réaction de la pyrophosphatase alcaline, soit seule, soit en présence de zinc, en fonction du temps, dans les conditions habituelles, au pH 8,2 ; nous avons eu les résultats suivants :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

Temps (minutes)	10	20	30	60	120	180	240
P. (mg.) ...	302	479	542	663	805	810	1058
V.	30	24	18	11	6,7	4,5	4,4

Cet ensemble de résultats confirme la valeur activateur du zinc et, au point de vue intensité, montre la faiblesse de l'activation due au zinc : en effet, si nous comparons l'activation par le magnésium, nous avons, au bout de 3 heures d'hydrolyse, un rapport $V = \frac{P}{t} = 5,6$ alors que, dans les mêmes conditions, mais, après activation par le zinc, notre rapport ne s'élève qu'à 4,5 et, pour la réaction non activée, est égal à 3,5.

Le fer. — BAMANN et HEUMULLER (1) ont observé, dans le foie de porc, une activation de la pyrophosphatase A_1 par l'ion fer II ; HORII et MORII (2) considèrent cet ion comme inhibiteur ainsi que tous les ions métalliques susceptibles d'être polyvalents.

Pour connaître l'action de l'ion fer II sur la pyrophosphatase alcaline du thymus, nous avons utilisé le

(1) BAMANN (E.) und HEUMULLER (E.). — *Naturw.*, 1940, 28, 535.

(2) HORII et MORII. — Cité d'après OPPENHEIMER (C.). — *Die Fermente und ihre Wirkungen*. Supplément Lief, W. Junk, éd., La Haye, 1935.

fer sous forme de sulfate ferreux en solution centimolaire ; nous avons eu le tableau suivant :

Macération de 48 heures :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	6	7,1	8,2	8,7	9,3	11
P % (sans effecteur)	18	27	33	27	12	0
P % (avec fer II)	10	18	21	16	9	1

L'ion fer II est donc nettement inhibiteur de la pyrophosphatase A₁ du thymus.

Le cuivre. — Ainsi que nous l'avons déjà remarqué à propos de la phosphomonoestérase A₁, c'est par dénaturation de protéines que le cuivre agit, plutôt que par réaction sur une pyrophosphatase bien déterminée. Le cuivre est utilisé sous forme de sulfate de cuivre en solution centimolaire ; nous avons obtenu les résultats suivants :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	6,3	7,2	7,5	8,2	8,9	10,5
P % (sans effecteur)	15	26	30	34	22	3
P % (avec cuivre 0,01 M) ..	2	3	3	5	2	0

L'action inhibitrice du cuivre est très grande et annihile, presque intégralement, l'action pyrophosphatase.

Nous avons également étudié l'action de l'ion cuivre à une concentration très faible ($2 \cdot 10^{-5}$ M) dans les mêmes conditions que précédemment :

pH	6,3	7	7,6	8,2	9	11
P % (sans effecteur)	15	26	30	34	22	3
P % (avec cuivre $2 \cdot 10^{-5}$ M) ..	20	32	37	44	32	4

Dans ces résultats, nous relevons une légère activation de la pyrophosphatase. Cependant, comparée à

la force d'inhibition obtenue au tableau précédent, elle paraît faible : toutefois, elle permet de confirmer les conclusions d'HORII et MORII, suivant lesquelles les métaux susceptibles d'être polyvalents peuvent, quand leur concentration s'abaisse, devenir activateurs après avoir été inhibiteurs.

b) LES ANIONS.

Les fluorures. — Les fluorures sont signalés comme étant sans action sur la pyrophosphatase A_1 par certains auteurs (1). Cependant, dans le foie et l'intestin, on a noté une activation légère.

L'ion fluor est utilisé à l'état de fluorure de sodium en solution centimolaire :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	6,3	6,8	7,5	8,2	8,9	10,5
P % (sans effecteur)	15	22	28	33	22	4
P % (avec fluorure de sodium) ..	10	15	21	25	19	4

Dans ce cas nous avons noté une inhibition assez importante. Mais si nous examinons les résultats obtenus dans le tableau suivant avec l'enzyme purifié par dialyse :

Macération dialysée de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	6,3	6,8	7,6	8,2	8,8	10,7
P % (sans effecteur)	15	23	27	33	22	0
P % (avec fluorure de sodium) ..	14	22	27	32	22	1

Nous constatons la disparition de l'inhibition et l'ion fluor est alors pratiquement sans action sur l'enzyme A_1 .

(1) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.

ROCHE (J.), Mlle de LAROMIGUIÈRE (S.) et Mlle LAURENS (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 1019.

Les cyanures. — Cet ion serait légèrement activateur à une concentration inférieure à 0,002 M et il deviendrait inhibiteur dans le cas contraire. Nous avons étudié le produit frais de macération puis la poudre acétonique traités par le cyanure de potassium à la concentration centimolaire :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'étuve à 37° :

pH.....	6	7,2	7,7	8,2	9,5	11
P % (sans effecteur)	15	23	27	30	13	0
P % (avec cyanure de potassium)	9	15	20	23	11	0

Poudre acétonique :

3 heures d'étuve à 37° :

pH.....	6	7,2	7,7	8,2	9,5	11
P % (sans effecteur)	10	16	18	20	8	0
P % (avec cyanure de potassium)	6	10	14	16	8	0

L'ion cyanogène est donc inhibiteur de la pyrophosphatase A_1 , cependant cette inhibition est peu élevée dans le cas de la poudre acétonique, donc nous ne sommes pas loin du point d'inversion de l'action. Aussi nous avons cherché l'action de l'ion cyanogène en fonction de la concentration à pH 8,2 :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

Concentration	0	0,0005 M	0,001 M	0,002 M	0,004 M	0,01 M
P %	30	48	40	32	28	23

La concentration, pour laquelle l'ion cyanogène est sans action sur la pyrophosphatase A_1 du thymus, est approximativement, 0,00025 M.

L'acide oxalique. — L'action de l'ion oxalique a été étudiée par de nombreux auteurs. Selon MUNEMURA, ce serait un inhibiteur puissant, pour ROCHE et ses collaborateurs, il n'aurait qu'une action peu sensible, parfois même indifférente.

L'ion oxalique est utilisé à l'état d'oxalate de po-

tassium en solution centimolaire ; les études ont été faites sur du produit frais de macération et sur la poudre acétonique :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'étuve à 37° :

pH	6,8	7,2	7,7	8,2	9	10,5
P % (sans effecteur) ..	15	21	28	30	17	3
P % (avec oxalate) ...	11	16	23	25	14	1

Poudre acétonique :

3 heures d'étuve à 37° :

pH	6,8	7,2	7,7	8,2	9	10,5
P % (sans effecteur) ..	10	14	18	22	12	0
P % (avec oxalate) ...	6	10	14	16	10	0

L'ion oxalique est donc inhibiteur de la pyrophosphatase A₁, cependant cette inhibition reste faible.

c) LES CORPS ORGANIQUES.

La vitamine C. — La vitamine C est légèrement inhibitrice surtout à des concentrations faibles (1) : cette inhibition s'affaiblit et la vitamine C perd son influence pour des concentrations plus élevées. Elle devient faiblement activatrice dans certains cas (intestin) alors que, dans le cas de la phosphomonoestérase A₁, elle était toujours légèrement activatrice.

Nous avons étudié l'action de la vitamine C en fonction de la concentration. Le milieu était tamponné à pH 8,2, l'action a porté sur la poudre acétonique et la macération de 48 heures de produit frais avec 3 heures d'étuve à 37° :

Concentration en vitamine C (g. ‰) ..	0	0,4	1	2	5	10
P % (produit frais)	31	24	24	26	28	30
P % (poudre acétonique)	22	16	18	18	20	22

(1) Mlle de LAROMIGUIÈRE (S.). — *Thèse Doctorat Université Pharmacie, Marseille, 1942.*

L'inhibition, relativement forte au début, devient de plus en plus faible et arrive à une valeur pratiquement nulle, aux erreurs d'expérience près. Nous ne relevons pas d'activation dans les fortes concentrations, alors que, pour la phosphomonoestérase A_1 , nous avons trouvé une activation de 18 %.

L'acide cholique. — Cet acide est sans action sur la pyrophosphatase alcaline quelle que soit son origine, exceptée celle qui est extraite du rein ; cette dernière, en effet, serait faiblement inhibée par l'acide cholique d'après Mlle DURAND (1).

Dans l'étude du thymus nous avons recherché l'action de l'acide cholique à la concentration centimolaire sur le produit frais de macération et la poudre acétonique. L'étude, faite dans les conditions habituelles, a donné les résultats suivants :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7	7,5	8,2	8,9	9,7	11
P % (sans effecteur)	17	27	34	21	13	1
P % (avec acide cholique) .	13	24	28	16	11	2

Poudre acétonique :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	7	7,5	8,2	8,9	9,7	11
P % (sans effecteur)	16	22	24	18	12	0
P % (avec acide cholique) .	10	18	20	16	10	2

Dans les deux cas, nous avons trouvé une légère inhibition de la pyrophosphatase alcaline.

L'alanine. — Ce dérivé est signalé par certains auteurs (2) comme sans action. L'étude, sur le produit

(1) Mlle DURAND (J.). — *Thèse Doctorat Université Pharmacie, Marseille, 1943.*

(2) Mlle LAURENS (A.). — *Thèse Doctorat Université Pharmacie, Marseille, 1942.*

frais et la poudre acétonique, a donné les résultats suivants en prenant l'alanine sous forme de solution centimolaire :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'étuve à 37° :

pH	6,3	7	7,7	8,2	9,3	10,3
P % (sans effecteur) ..	18	22	27	32	18	0
P % (avec alanine) ...	19	25	32	38	21	2

Poudre acétonique :

3 heures d'étuve à 37° :

pH	6,3	7	7,7	8,2	9,3	10,3
P % (sans effecteur) ..	14	14	16	24	12	0
P % (avec alanine) ...	14	16	22	28	14	0

Nous avons trouvé ici une très légère activation, plus marquée dans le cas du produit frais.

La cystine. — Parmi les dérivés soufrés organiques, la cystine est souvent utilisée pour connaître l'action des groupements disulfure et thiol, qu'elle donne par réduction, sur les pyrophosphatases. Selon Mlle LAURENS, la cystine serait un inhibiteur faible, pour Mlle de LAROMIGUIÈRE (1) elle serait sans action sur la pyrophosphatase A₁ après purification ; pour cet auteur, le glutathion, tripeptide renfermant la cystéine, pourrait même être activateur à forte concentration. Nous avons recherché l'action de la cystine sur les pyrophosphatases du thymus, pris soit sous forme de produit frais de macération, soit sous forme de poudre acétonique :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'étuve à 37° :

pH	6,3	7,2	7,8	8,2	9,1	10,6
P % (sans effecteur) ..	16	22	27	33	20	0
P % (avec cystine) ...	15	20	27	32	20	1

(1) Mlle de LAROMIGUIÈRE (S.). — *Thèse Doctorat Université Pharmacie, Marseille, 1942.*

Poudre acétonique :

3 heures d'étuve à 37° :

pH	6,3	7,2	7,8	8,2	9,1	10,6
P % (sans effecteur) ..	10	14	18	24	14	0
P % (avec cystine)	10	14	16	24	13	0

La cystine ne semble pas avoir une influence notable sur la pyrophosphatase A_1 du thymus.

Le cholestérol. — De même que dans l'étude des phosphomonoestérases, cet élément s'est révélé sans action.

d) LES COUPLES EFFECTEURS.

Vitamine C - cuivre. — GIRI (1) a établi que l'ion cuivre, en présence de la vitamine C et de l'acide déhydroascorbique, avait sur la pyrophosphatase A_1 une action inhibitrice moins forte que sur la phosphomonoestérase. Nous avons étudié ce fait sur la macération de produit frais et sur la poudre acétonique en mettant du cuivre à une concentration 2.10^{-5} M ; en maintenant le pH à 8,2 et en faisant varier la concentration de la vitamine C ; les résultats ont été les suivants :

Macération de 48 heures de produit frais :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

Vitamine C (g. o/oo) ...	0	0,4	1	2	5	10
Sans cuivre	31	24	24	26	28	30
Avec cuivre	35	30	26	22	18	15

Poudre acétonique :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

Vitamine C (g. o/oo) ...	0	0,4	1	2	5	10
Sans cuivre	23	16	18	18	20	22
Avec cuivre	26	24	20	16	10	8

(1) GIRI (K-V.). — *Z. physiol. Chem.*, 1937, **245**, 185.

Le cuivre, qui, à très faible concentration, est activateur de la pyrophosphatase A_1 (ce qui confirme la thèse de HORII et MORII), forme avec la vitamine C un couple inhibiteur assez puissant.

Alanine - zinc. — De même que les phosphomonoestérases, les pyrophosphatases se montrent, dans certains cas, très activées par le couple alanine - zinc : il en serait ainsi avec la muqueuse intestinale de rat et de chien [HOVE (1)]. Nous avons fait une étude semblable sur la macération de produit frais et sur la poudre acétonique de thymus, en tamponnant les solutions au pH 8,2, et en mettant les deux éléments à la concentration 0,01 M. :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

Effecteur	Néant	Alanine	Zinc	Alanine - zinc
Produit frais	30	35	34	34
Poudre acétonique	22	26	26	26

Le couple alanine - zinc aurait donc la même action que lorsque les composants agissent isolément.

En résumé, l'étude de la pyrophosphatase A_1 du thymus a permis de définir son pH optimum d'action qui est de 8,1. Si cette phosphatase se rapproche par sa distribution et certaines de ses réactions de la phosphomonoestérase A_1 , son activité reste toujours moins intense.

(1) HOVE (E.), ELVEHJEM (C-A.) and HART (E-B.) — *J. Biol. Chem.*, 1940, 134, 425.

B) Etude de la pyrophosphatase A_2 .

1°) **L'enzyme.** — En 1931, TAKAHASHI (1) obtint, à partir du son de riz, un enzyme hydrolysant les pyrophosphates à un pH voisin de 5 ; BAMANN et GALL (2), en 1937, le retrouvèrent dans la poudre acétonique obtenue à partir de l'extrait de poudre de foie. Très souvent associé à la phosphomonoestérase A_2 acide, la pyrophosphatase A_2 a un pH optimum, variant dans les mêmes limites, de 4,5 à 6 et située généralement vers 5,6 ; elle existe dans le foie, le rein (3), le sérum, les hématies (4), le cerveau, les levures basses (5), les graines (6) et dans de nombreux organes animaux (7). NGUYEN van THOAI (8) l'a retrouvée dans des préparations de basidiomycètes, mais seulement après dialyse et adsorption alors que la pyrophosphatase A_1 n'avait pu être mise en évidence. Plus stable que cette dernière, cet enzyme peut être séparé par inactivation sélective.

La pyrophosphatase A_2 acide a été étudiée pour déterminer son pH optimum d'action avec précision,

-
- (1) TAKAHASHI (H.). — *J. Biochem. Japan*, 1932, **16**, 463.
 - (2) BAMANN (E.) und GALL (H.). — *Biochem. Z.*, 1937, **293**, 1.
 - (3) DURAND (J.). — *Thèse Doctorat Université (Pharmacie)*, Marseille, 1943.
 - (4) BAUDOUIN (J.). — *Thèse Doctorat Etat Pharmacie*, Marseille, 1943.
 - (5) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.
 - (6) COURTOIS (J.). — *Thèse Doctorat Sciences physiques*, Paris, 1938.
 - (7) BAMANN (E.) und SALZER (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, **286**, 147.
 - (8) NGUYEN VAN THOAI. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, **23**, 1277.

sur la poudre acétonique de thymus, en suivant la technique habituelle :

Poudre acétonique :

3 heures d'hydrolyse à 37° :

pH ...	4,9	5,2	5,4	5,6	5,8	6	6,3
P %	36	38	38	40	38	35	30

Le pH optimum d'action de la pyrophosphatase A_2 du thymus est donc de 5,6.

2°) **Les effecteurs de la pyrophosphatase A_2 .** —

Comme pour l'enzyme alcalin, nous avons étudié successivement : les cations métalliques, les anions, enfin les corps organiques et les couples formés par ces derniers avec les cations.

a) **LES CATIONS.**

Le magnésium. — MUNEMURA (1), BAMANN et GALL (2) ont signalé que la pyrophosphatase A_2 était insensible à l'action du magnésium ; ROCHE et Mlle BAUDOUIN (3) lui attribuent, au contraire, une action activatrice notable.

Les recherches sur le thymus ont porté sur le produit frais de macération ; le magnésium a été utilisé sous forme de solution centimolaire de sulfate de magnésium. Afin d'avoir des résultats plus nets, le temps d'hydrolyse a été doublé :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	3,7	4,4	4,9	5,2	5,5	5,8	6,5
P % (sans effecteur)	0	15	18	25	30	35	15	17
P % (avec magnésium)	0	18	21	28	33	39	17	20

(1) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.

(2) BAMANN (E.) und GALL (H.). — *Biochem. Z.*, 1937, **293**, 1.

(3) ROCHE (J.) et Mlle BAUDOUIN (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 245.

La pyrophosphatase A_2 est donc peu sensible à l'action de l'ion magnésium.

Le manganèse. — D'après BAMANN, le manganèse n'exerce aucune action et, dans les conditions habituelles (sulfate de manganèse en solution centimolaire), nous avons confirmé ce résultat dans le cas du thymus :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	2,8	3,6	4,4	4,7	5,1	5,6	6	6,3
P % (sans effecteur)	0	14	18	24	29	34	14	16
P % (avec manganèse)	0	13	20	25	29	33	13	17

Le calcium. — MUNEMURA pense que le calcium serait sans action sur la pyrophosphatase A_2 , quelle que soit son origine ; les résultats indiqués dans le tableau suivant nous permettent d'arriver aux mêmes conclusions :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	2,3	3,9	4,6	5,2	5,6	6	6,3
P % (sans effecteur) ..	0	17	22	29	32	23	24
P % (avec calcium) ...	0	18	22	20	33	24	25

Le calcium est indifférent à l'action de la pyrophosphatase A_2 du thymus.

Le zinc. — Selon HORII (1), l'ion zinc serait un inhibiteur puissant de la pyrophosphatase A_2 , alors qu'il était activateur de la pyrophosphatase A_1 . Cet effet serait maximum pour une concentration de 0,01 M. Les expériences, réalisées à partir du thymus dans

(1) HORII. — Cité d'après OPPENHEIMER (C.). — *Die Fermente und ihre Wirkungen*. Supplement Lief, 1935, W. Junk, éd., La Haye.

les conditions habituelles, permettent d'établir le tableau suivant :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	4,3	5,2	5,6	6	6,3
P % (sans effecteur) ..	5	15	25	33	27	28
P % (avec le zinc) ...	3	11	13	14	21	28

Le zinc inhibe donc fortement la pyrophosphatase A₂ du thymus.

Le fer. — Pour Mlle DURAND, l'ion fer II serait insensible sur la pyrophosphatase A₂ de muqueuse intestinale du chien et inhiberait, par contre, l'enzyme du foie de chien et du rein de bœuf. Nous avons cherché l'action de l'ion fer II à propos du thymus :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	4,5	5,2	5,6	6	6,3
P % (sans effecteur)	3	15	23	30	20	25
P % (avec l'ion fer II 0,01 M)	0	2	3	5	10	12

D'après ces résultats, la pyrophosphatase A₂ du thymus est inhibée assez fortement par l'ion fer II à concentration centimolaire.

L'ion cuivre. — Cet élément agit ici par dénaturation de l'apophosphatase. Nous avons utilisé le cuivre sous forme de sulfate de cuivre en solution centimolaire :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	4,2	5,2	5,6	6,1	6,9
P % (sans effecteur) ..	0	16	28	34	26	30
P % (avec le cuivre) .	0	6	8	9,3	8,4	8

A cette concentration, l'ion cuivre est un inhibiteur puissant de la pyrophosphatase A₂. Cependant cette action n'est pas aussi énergique que celle que nous avons trouvée avec la pyrophosphatase A₁ du thymus.

b) LES ANIONS.

Les fluorures. — L'ion fluor est un inhibiteur général de la pyrophosphatase A_2 ; son action a été citée à propos du rein de porc et du son de riz par MUNEMURA (1), du foie par ROCHE et ses élèves (2). Nous avons essayé l'action du fluor à l'état de fluorure de sodium, en solution centimolaire :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	4,3	5,2	5,6	6,3	6,9
P % (sans effecteur)	3	16	21	32	17	24
P % (avec l'ion fluor)	0	0	4	6	2	1

Comme les autres auteurs, nous avons trouvé pour l'ion fluor une inhibition très nette pour la pyrophosphatase A_2 du thymus.

L'acide oxalique. — Selon MUNEMURA, les oxalates seraient des inhibiteurs faibles de la pyrophosphatase A_2 du rein, ROCHE et ses élèves signalent, par contre, une légère activation après purification par adsorption et élution, tant que l'ion oxalique n'est pas à une concentration supérieure à 0,01 M. Nous avons eu, avec cet effecteur, dans nos conditions habituelles, les résultats suivants :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	3,7	4,2	5,2	5,6	6	7
P % (sans effecteur)	3	9	21	27	36	32	40
P % (avec l'ion oxalique)	0	0	9	9	15	12	36

L'inhibition de la pyrophosphatase A_2 par l'ion

(1) MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.

(2) ROCHE (J.), NGUYEN VAN THOAI et Mlle (BAUDOIN (J.)). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 1247.

oxalique est très nette. Cette action est toutefois plus faible que celle rencontrée lors de l'étude du fluor.

Les cyanures. — Le produit frais de macération de thymus a été traité par le cyanure de potassium de façon à atteindre une concentration centimolaire :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	4,3	5,2	5,6	6	7
P % (sans effecteur) ..	4	12	24	32	26	38
P % (avec cyanure) ..	0	2	14	24	20	30

Ce tableau montre l'action inhibitrice de l'ion cyanogène sur la pyrophosphatase A_2 du thymus.

c) LES EFFECTEURS ORGANIQUES.

La vitamine C. — La pyrophosphatase A_2 est activée par l'acide ascorbique ainsi que Mlle BAUDOIN (1) l'a montré dans l'étude du système pyrophosphatasique des hématies. Nous avons cherché comment la vitamine C agissait sur la pyrophosphatase A_2 . La concentration en vitamine C était la même dans toutes les expériences et égale à celle qui, pour la pyrophosphatase A_1 , avait donné l'inhibition plus forte (c'est-à-dire à 0 g. 4 par litre) :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	4	5,2	5,6	6	7,3
P % (sans effecteur)	2	13	20	30	24	38
P % (avec vitamine C)	3	16	28	40	34	37

L'action de la vitamine C sur la pyrophosphatase A_2 est donc activatrice dans le cas du thymus.

(1) Mlle BAUDOIN (J.). — *Thèse Doctorat Etat Pharmacie*, Marseille, 1943.

L'acide cholique. — D'après Mlle de LAROMIGUIÈRE (1) l'acide cholique n'exercerait pas d'action sur la pyrophosphatase A_2 de l'intestin; toutefois Mlle BAUDOUIN (2), dans l'étude du système pyrophosphatasique du foie, a montré que ce corps avait une action inhibitrice si sa concentration atteignait 0,01 M. Nous avons étudié cette action suivant les procédés habituels :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	2	3	4	5,2	5,8	6,3
P % (sans effecteur)	1	4	14	24	30	24
P % (avec acide cholique) .	1	3	10	16	20	16

L'acide cholique agit donc comme inhibiteur de la pyrophosphatase A_2 du thymus.

L'alanine. — L'étude de l'action de l'alanine sur la pyrophosphatase A_2 a montré que cet acide aminé jouait un rôle activateur ainsi que le montre le tableau suivant :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	4	5,1	5,5	5,9	6,3
P % (sans effecteur) ..	4	16	23	34	28	25
P % (avec alanine)	6	20	32	42	36	30

d) LES COUPLES EFFECTEURS.

Vitamine C - cuivre. — Dans cette étude, la vitamine C a été utilisée à la dose de 0 g. 5 par litre, et le cuivre à la concentration de 2.10^{-5} M. Le tableau

(1) Mlle de LAROMIGUIÈRE (S.). — *Thèse Doctorat Université Pharmacie*, Marseille, 1942.

(2) Mlle BAUDOUIN (J.). — *Thèse Doctorat Etat Pharmacie*, Marseille, 1943.

suivant montre que le couple vitamine C - cuivre exerce une légère activation :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	4	4,9	5,1	5,5	6	6,3
P % (avec cuivre 2.10^{-5} M)	0	16	27	30	38	28	25
P % (avec cuivre et vitamine C) .	3	17	30	36	43	37	35

Nous avons également envisagé l'action du couple vitamine C - cuivre en faisant varier seulement le taux de concentration en vitamine C et en maintenant le pH constant à une valeur de 5,6 :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

Vitamine C (g. par litre)	0	0,2	0,5	1	2	5	10
P % (sans cuivre)	32	41	39	37	37	35	33
P % (avec cuivre)	36	48	44	39	35	32	28

Le couple devient donc légèrement inhibiteur quand la concentration en vitamine C augmente, cependant cette inhibition reste faible.

Alanine - zinc. — Comme pour les autres enzymes, nous avons recherché l'influence de ce couple pour la pyrophosphatase A_2 en utilisant les mêmes concentrations de zinc et d'alanine en solution centimolaire ; les résultats suivants ont été obtenus :

Macération de 48 heures de produit frais :

6 heures d'hydrolyse à 37° :

pH	3	4	4,7	5,2	5,6	6,3	6,9
Avec zinc	6	10	13	14	15	28	31
Avec alanine-zinc	6	12	13	16	17	28	30

L'action du couple alanine - zinc est à peu près semblable à celle du zinc agissant isolément.

L'étude de la pyrophosphatase A_2 acide du thymus nous a permis de fixer son pH optimum d'action qui est de 5,6. Elle est à rapprocher de la phosphomonoestérase A_2 correspondante. L'action des effecteurs est beaucoup moins importante que pour la pyrophosphatase alcaline.

Nous retrouvons dans le système pyrophosphatase du thymus l'influence prépondérante de l'enzyme alcalin. L'étude du système phosphomonoestérase nous avait conduit à des résultats semblables.

CHAPITRE V

LES SYSTÈMES PHOSPHATASIQUES SECONDAIRES DU THYMUS.

Parmi ceux-ci, nous verrons successivement : les systèmes phosphodiésterasique et métaphosphatasique, et les phytinases du thymus.

A) Le système phosphodiésterasique du thymus.

Des expériences ont montré que l'on ne pouvait pas attaquer les diesters phosphoriques par les phosphomonoestérases sans les avoir, au préalable, soumis à l'action d'une diastase spécifique. Mais celle-ci serait très souvent accompagnée par une phosphomonoestérase. AZAKAWA (1), en se basant sur la libération lente d'acide orthophosphorique à partir de ces diesters, avait pensé à la présence d'un activateur de la phosphomonoestérase permettant ainsi son action sur le diester ou encore de deux diastases.

(1) AZAKAWA. — *J. Biochem.*, 1928, 10, 157.

UZAWA (1) chercha à obtenir, par adsorption spécifique sur gel silicique, hydroxyde ferrique ou kaolin, une phosphomonoestérase sans activité diestérasique à partir d'un extrait de son de riz. Il chercha également sur des venins de serpents ; il aurait réussi à montrer que le venin de certains serpents (Habu - Mamuschi) contenait un enzyme susceptible d'attaquer le diphénylphosphate et non le monophénylphosphate. Le pH optimum d'action de cette diestérase serait 8,6. AZAKAWA a indiqué un pH optimum d'hydrolyse des diesters par le mélange des phosphatases du rein, de 7,8.

HOTTA (2) a observé deux optima à pH 7,8 et 5. D'après UDAGAWA (3), il y aurait deux espèces de diestérases dans les organes animaux, l'une à pH 9, comme chez les serpents, l'autre à pH compris entre 5 et 6. Toutefois cet auteur reconnaît ne pas avoir réussi à extraire les diestérases dans un état exempt de monoestérases.

Nous avons recherché les diestérases du thymus. Le substrat utilisé a été le diméthylphosphate de sodium (4) en solution aqueuse contenant 0 g. 700 de

(1) UZAWA. — *J. Biochem.*, 1932, **15**, 11.

(2) HOTTA. — *J. Biochem.*, 1934, **20**, 343.

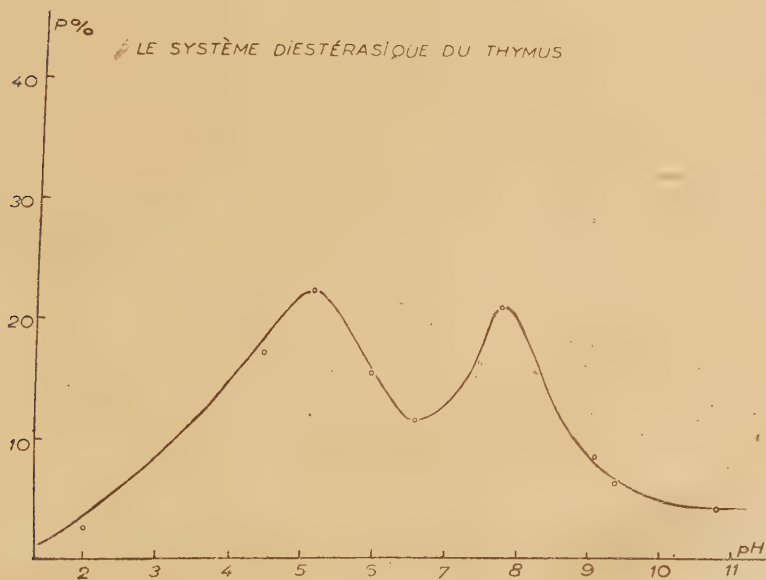
(3) UDAGAWA. — *J. Biochem.*, 1935, **22**, 2.

(4) Ce composé a été préparé de la manière suivante : le pentachlorure de phosphore (1 mol.) est ajouté par petites quantités à de l'alcool méthylique (4 mol.) en solution étherée. Après un repos de 3 heures, le mélange est neutralisé par une bouillie de carbonate de baryum. Le liquide, filtré, est traité par une solution concentrée de sulfate de sodium. Le sulfate de baryum étant éliminé, le taux de diméthylphosphate est déterminé par dosage du phosphore après hydrolyse sulfurique.

phosphore par litre. Nous avons utilisé l'organe frais en macération aqueuse de 48 heures. Le temps d'hydrolyse a été porté à 72 heures par suite de l'extrême résistance des diesters :

pH ...	2	3,6	4,5	5,2	6	6,6	7,5	7,8	8,1	9,1	9,4	10,8
P % .	2,6	16,2	17	22,1	15,2	11,4	16,2	20,7	10	8,3	6	4

Les résultats précédents sont indiqués dans la courbe ci-dessous :



Une solution-témoin de diméthylphosphate de sodium, portée à différents pH, n'a pas donné de libération d'acide phosphorique.

Les deux valeurs obtenues ne correspondent ni à des phosphomonoestérases ni à des pyrophosphatases. Les valeurs trouvées, 5,2 et 7,8, sont voisines de celles que HOTTA a données pour les diestérases.

Il semble donc possible qu'il y ait dans le thymus deux phosphodiesterases : l'une à pH optimum 5,2 et l'autre à pH optimum 7,8.

B) Le système métaphosphatasique du thymus.

Ce système est formé par la métaphosphatase. C'est le seul enzyme susceptible d'agir sur un substrat inorganique n'existant pas dans les cellules animales ; il n'hydrolyse pas d'ailleurs ce substrat, mais catalyse une réaction d'hydratation en transformant le métaphosphate en orthophosphate.

La métaphosphatase a été observée par KITASATO (1) dans la levure, les extraits de foie, de rein, mais non dans ceux des muscles.

Nous avons recherché cet enzyme dans le thymus : le temps d'hydrolyse, à 37°, a été de 3 heures, puis de 24 heures ; les essais ont été faits sur le produit frais et sur la poudre acétonique :

Produit frais :

pH	1,8	3,6	4,8	5,2	5,7	7,15	7,9	8,4	9,1	10,7
3 heures	0	0	1	2	2	2	2	3	2	0
24 heures	2	2	3	5	4	3	5	4	5	0

Poudre acétonique :

pH	1,8	3,6	4,8	5,7	7,15	7,9	8,4	9,1	9,5	10,7
3 heures	0	0	0	1	2	2	2	2	0	0
24 heures	0	1	1	1	3	4	4	4	2	2

Ainsi ces deux tableaux donnent le même résultat ; mais les valeurs obtenues ne sauraient être prises en considération, vu leur faiblesse. D'autre part, le dosage par la méthode de Briggs est moins précis dans ce cas par suite de l'action de l'acide sulfurique trou-

(1) KITASATO. — *Biochem. Z.*, 1928, **197**, 257 et 1928, **201**, 206.

vée lors du dosage des phosphates en présence de pyrophosphates, aussi la technique préconisée par Mlle DURAND (1) est-elle utilisée (cf. page 49).

C) Les phytinases.

La phytine est un monoester exigeant une phosphomonoestérase d'un type particulier. La phytine est, en effet, l'ester hexaphosphorique de l'inositol ; son étude, entreprise par PLIMMER (2), DAS, COLLIN, HART et STARKENSTEIN (3), ADLER (4) et SHINODA (5) n'a pu éclaircir entièrement les questions qu'elle a pu poser à son sujet :

Cet enzyme, qui permet son hydrolyse, est-il identique aux phosphomonoestérases, ou bien est-il différent ?

Pour essayer de résoudre ce problème, HORIUCHI entreprit l'étude de la takadiastase, du son de riz et de l'extrait de rein sur la phytine et le glycérophosphate. Le ferment du son de riz attaque, à pH 4,3, la phytine et permet une hydrolyse totale. Aucune action ne se produit avec la takadiastase ; l'extrait de rein attaque la phytine à pH 4,3 et non à pH 9 comme le glycérophosphate.

Nous avons étudié l'influence des préparations de thymus sur la phytine en solution aqueuse contenant

(1) Mlle DURAND (J.). — *Thèse Doct. Univ. Pharm.*, Marseille, 1943.

(2) PLIMMER. — *Biochem. J.*, 1913, **7**, 43.

(3) DAS, COLLIN, HART et STARKENSTEIN. — Cité d'après FOLLEY et KAY. — *Ergebn. der Enzymforschung*, 1936, **5**, 159 ; *tab. biol.*, 1937, **12**, 268.

(4) ADLER. — *Biochem. Z.*, 1916, **75**, 319.

(5) SHINODA. — *Centralb. für Bakt. Parasit. für Infektionskrl*, 1927, **11** abt. 71, 232.

0 g. 700 par litre de phosphore à l'état d'acide phosphorique estérifiant l'inositol :

48 heures de macération :

24 heures d'étuve à 37° :

pH ...	1,9	3,8	4,6	5,1	5,6	7,2	7,8	8,2	9,1	10,6
P % .	0	2	7	10	12	8	10	12	9	0

Les valeurs obtenues sont faibles et ne permettent pas de distinguer deux enzymes hydrolysant la phytine ; elles ne sont pas dues à l'hydrolyse chimique puisque aux pH extrêmes, celle-ci est nulle. Toutefois nous ne devons pas perdre de vue l'action importante des enzymes phosphomonoestérasiques laissant l'existence d'une ou deux phytinases très incertaines.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Le thymus, outre son action par sa sécrétion interne, est un organe lymphopoïétique important ; il intervient, en effet, dans la formation des nucléoprotéides, constituants primordiaux des leucocytes et composés de protéides unis à des acides thymonucléiques dont les éléments fondamentaux sont les nucléotides ; la synthèse de ces derniers, qui sont des esters phosphoriques, font de cette glande le siège de réactions de phosphorylation catalysées par de nombreux systèmes phosphatasiques.

L'étude des phosphatases du thymus a été effectuée sur des organes frais ainsi que sur des préparations à base de poudres acétoniques ; ce dernier procédé nous a permis de pallier, dans une certaine mesure, à une insuffisance d'approvisionnement en organes et d'obtenir également un ensemble de résultats plus homogènes. L'autolyse cellulaire a été réalisée en des temps variables et les meilleures conditions d'expérience ont été obtenues en 48 heures. L'action de la température a été également envisagée : nos recherches ont été réalisées à la température ordinaire qui nous a donné les meilleurs résultats. Des techniques de purification ont été mises en œuvre :

— La dialyse a permis d'éliminer des préparations certaines impuretés, en particulier les électrolytes et des dérivés chimiques de nature relativement simple.

— L'adsorption, par contre, fixe un groupe de diastases sur un support déterminé, à partir duquel elles sont libérées par élution.

— L'action des ions H^+ inactive enfin certaines phosphatases.

Nous avons pu établir ainsi les différents systèmes phosphatasiques du thymus :

1) Le système phosphomonoestérasique.

Ce système, qui domine l'activité phosphatasique du thymus, comprend deux enzymes :

a) LA PHOSPHOMONOESTÉRASE A_1 .

Cette phosphatase (pH optimum : 9,1), la plus importante du thymus, est influencée par l'action des différents effecteurs ; elle est activée surtout par le magnésium et, à des degrés moindres, par le manganèse et le calcium ; le cuivre, le fer et le zinc, les fluorures, cyanures et oxalates ont, par contre, un rôle inhibiteur.

Parmi les corps organiques, l'alanine est légèrement activatrice, tandis que l'acide cholique et la cystine sont inhibiteurs. La vitamine C a une action variable. L'association de corps organiques avec certains ions métalliques a permis de confirmer l'hypothèse du couple effecteur vitamine C - cuivre qui est inhibiteur.

b) LA PHOSPHOMONOESTÉRASE A_2 .

Cette phosphatase (pH optimum : 5,5) est influencée par les divers effecteurs signalés dans l'étude de l'enzyme précédent ; elle subit une action semblable mais

moins importante, toutefois la vitamine C et les couples effecteurs n'ont aucune activité.

2) Le système pyrophosphatasique.

Cet système, comme le précédent, comprend deux enzymes :

a) LA PYROPHOSPHATASE A_1 .

Cette phosphatase (pH optimum : 8,1) est associée à la phosphomonoestérase A_1 , toutefois son activité est moindre. Elle est activée par le magnésium, le manganèse, le calcium et le zinc, inhibée par le fer. Le cuivre et les cyanures ont une action variable, alors que les fluorures n'ont aucune influence. Le couple vitamine C - cuivre est légèrement inhibiteur, ainsi que l'acide cholique.

b) LA PYROPHOSPHATASE A_2 .

Cet enzyme (pH optimum : 5,6) est associé à la phosphomonoestérase A_2 et a une intensité plus faible que le précédent. L'action du magnésium est peu marquée. Le zinc, le fer, le cuivre, les fluorures sont fortement inhibiteurs ; le manganèse et le calcium semblent sans action, alors que celle du couple vitamine C - cuivre reste peu marquée.

3) Les systèmes phosphatasiques secondaires.

Ces systèmes groupent deux phosphodiéstérases qui ont respectivement pour pH optimum 5,2 et 7,8. La présence des phytinases reste incertaine. Aucune métaphosphatase n'a été décelée.

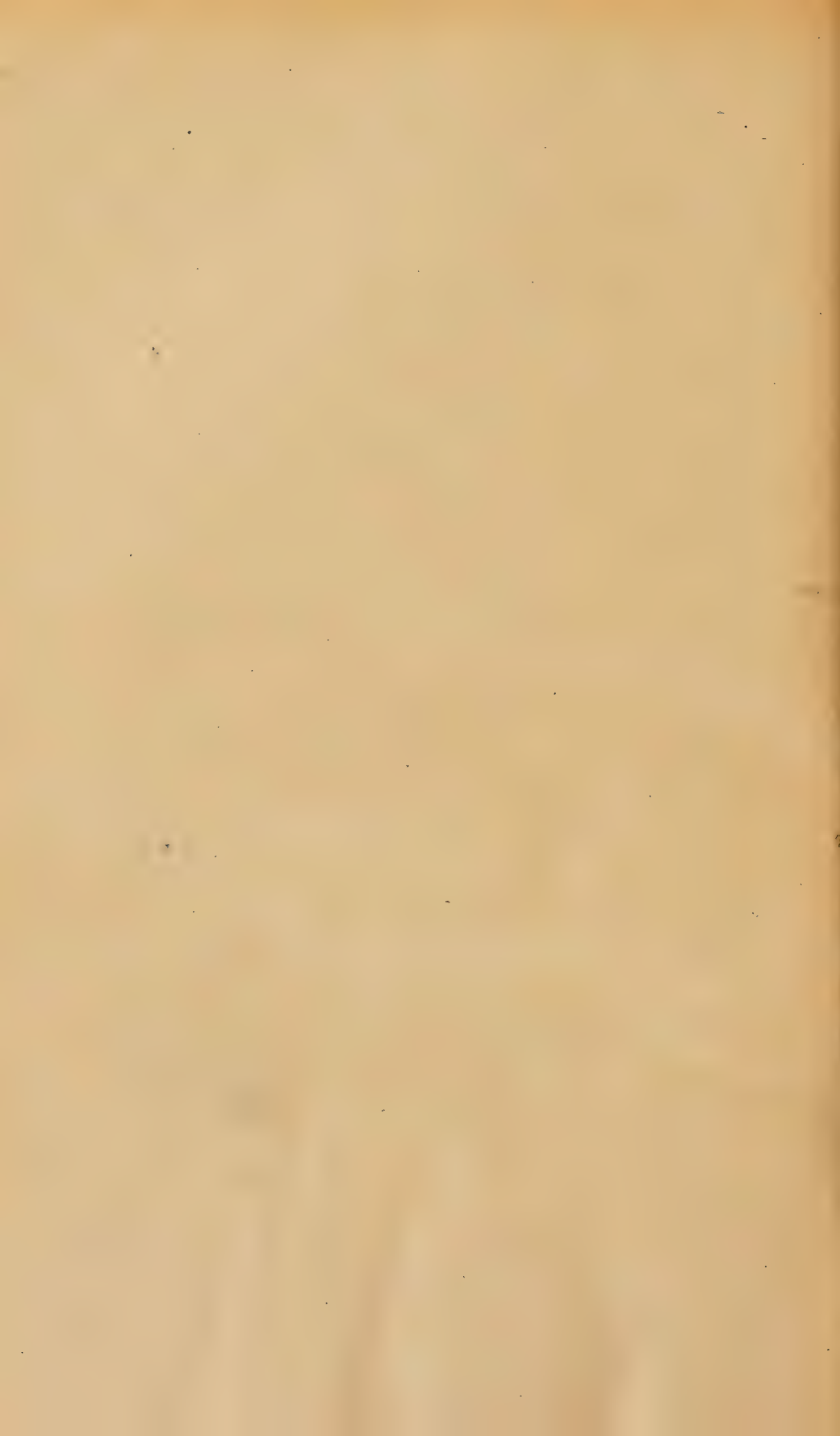


TABLE DES MATIÈRES

Introduction	11
--------------------	----

CHAPITRE PREMIER

Généralités sur les phosphatases	17
A) Extraction et purification	17
B) Classification des phosphatases	21
C) Constitution des phosphatases	26
D) Les effecteurs	31

CHAPITRE II

Mise en solution des phosphatases du thymus et dosage de leur activité	37
A) L'organe	37
B) Préparation de la macération du thymus	39
C) Etude de l'activité phosphatasique	42

CHAPITRE III

Le système phosphomonoestérasique du thymus	51
A) Etude de la phosphomonoestérase A_1	60
B) Etude de la phosphomonoestérase A_2	79

CHAPITRE IV

Le système pyrophosphatasique	91
<i>A)</i> Etude de la pyrophosphatase A_1	94
<i>B)</i> Etude de la pyrophosphatase A_2	110

CHAPITRE V

Les systèmes phosphatasiques secondaires du thymus	119
<i>A)</i> Le système phosphodiésterasique du thymus	119
<i>B)</i> Le système métaphosphatasique du thymus	122
<i>C)</i> Les phytinases	123
 Résumé et Conclusions	 125

En ma qualité de Censeur de
tour, j'ai lu la Thèse ayant pour
titre :

*Le système phosphatasique du
Thymus.*

par H. SOUCHE

Je pense que la Faculté peut
en permettre l'impression.

Montpellier, le 4 décembre 1944.

Le Professeur :
R. GRANGER.

Vu :

Montpellier, le 4 décembre 1944.

le Doyen :
A. ASTRUC.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Montpellier, le 5 décembre 1944.

pour le Recteur :
le Doyen délégué,
P. MATHIAS.

